

1

明細書

新規タンパク質およびそのDNAs

技術分野

本発明は、 Na^+ ／グルコーストランスポーター活性を有するタンパク質 (SGLT ホモログ)、或はタンパク質をコードするDNA、該DNAの一塩基多型 (SNPs) 体、該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法、該クリーニング方法で得られる化合物などを提供する。

)

10 背景技術

グルコースが細胞内外を移行するには、細胞膜上に輸送担体と呼ばれる膜タンパクが必要である。

グルコースの輸送担体は、受動輸送担体である促通拡散型グルコーストランスポーター (GLUT) と Na^+ イオン輸送と共に作用することでグルコースボーダー (SGLT) によって輸送する能動輸送担体である。

GLUT は、8種類のアイソフォームが存在し、分子量約 6 万の細胞膜を 12 回貫通する共通構造を有している。

SGLT は、分子量 7.5 万の細胞膜を 14 回貫通する共通構造を有している。

日本糖尿病 55, 1997, 増刊号、糖尿病 I, 59-64 には SGLT および 2 の機能や発現部位が概説されている。

ヒト SGLT1 は、小腸、腎臓に特異的に発現しグルコースに対して高親和性で輸送能は小さく、ヒト SGLT2 は、腎臓特異的に発現しグルコースに対して低親和性で輸送能は大きい事が知られている。SGLT1 は、グルコースの小腸からの吸収と、腎臓から一旦尿中に排出されたグルコースを再吸収する役割を担っている。

糖尿病モデルラットにおいて、SGLT を阻害することで、腎臓におけるグルコースの再吸収を抑制し、尿中にグルコースを排出することで血糖を低下する作用が示されている。Diabetes 48:1794-1800, 1999) これまで、肺 β 細胞、肝細胞では、受動輸送担体である GLUT2 が主に発現していると考えられてきた。GLUT2 はグルコースに対する低い親和性と高い最大輸送

2

能を特徴とする。肺 β 細胞では、血糖値に応じてグルコースを取り込み、グルコキナーゼと共にグルコース濃度依存性のインスリン分泌作用を示すためのグルコーズセンサーとして機能していると考えられている。肝細胞では、細胞内外のグルコース濃度勾配に従って、食後高血糖時には血中グルコースを細胞内に取り込み、空腹時にはグリコーゲン分解、あるいは糖新生によって細胞内で作られたグルコースを血中に放出する輸送担体として機能している。

ヒト SGLT1 は、小腸細胞において消化管ホルモンである GLP-2 の作用で細胞内から膜表面に移行し、糖取り込み活性が 3 倍に増加するという報告 (Am. J. Physiol. 273 R1966-R1971, 1997) がある。

現在使用されているインスリン分泌促進薬 (SUI 薬) は、肺 β 細胞の K_{ATP} チャネルを開鎖することにより、血糖値に関わらず強制的にインスリンを分泌させる。従つて、血糖コントロールが難しく低血糖を起こしたり、過剰なインスリン分泌により肥満を誘発したりする副作用があると考えられている。また、平均して 10 年で薬効がなくなる SUI 薬の二次無効と呼ばれる現象が起きるが、肺 β 細胞に痙攣を起すのが原因とも考えられている。

SGLT1 がモロログ機能を賦活化することにより、肺 β 細胞への糖取り込みを促進し、血糖値依存性のインスリン分泌を亢進することが期待できる。また、SGLT 機能の賦活化薬には、現在使用されているインスリン分泌促進薬 (SUI 薬) の前記副作用は起きないものと期待される。

肝細胞においては、GLUT2 が空腹時は肝臓から血中へグルコースを放出するのに對して、SGLT1 がモロログは細胞内外のグルコース濃度勾配に関わらず血中から肝臓への糖取り込みを促進するものと考証するものと考証するものが期待するこことが期待でき、糖尿病患者に認められる空腹時高血糖を低血糖などの副作用を起さずに対制することが期待される。

さらに、SGLT 阻害薬は、腎臓からの糖の再吸収を抑制することで脂肪合成を抑制することができ、肝臓への糖取り込みを抑制することで脂肪合成を抑制することが期待できる。

発明の開示

本発明者は、前記の課題を解決するために銳意研究を重ねた結果、新規 N-グルコーストランスポータータンパク質（ヒト SGLT ホモログ、マウス SGLT ホモログおよびラット SGLT ホモログ）を見出した。該ヒト SGLT ホモログはアミノ酸レベルで、ヒト SGLT1 と 52%、ヒト SGLT2 と 52%、マウス SGLT1 と 63%、マウス SGLT2 と 51%、ラット SGLT1 と 52% およびラット SGLT2 と 51% の高い相 同性を示し、該マウス SGLT ホモログはアミノ酸レベルで、ヒト SGLT1 と 52%、ヒト SGLT2 と 52%、マウス SGLT1 と 53%、マウス SGLT2 と 50%、ラット SGLT1 と 51% およびラット SGLT2 と 50% の高い相 同性を示し、該ラット SGLT ホモログはアミノ酸レベルで、ヒト SGLT1 と 52%、ヒト SGLT2 と 52%、マウス SGLT1 と 53%、マウス SGLT2 と 49%、ラット SGLT1 と 52% およびラット SGLT2 と 48% の高い相 同性を示す。該ヒト、マウスおよびラット SGLT ホモログは、何れも 14 回膜質通型の構造を有しており、グルコースの能動輸送組合として機能し得るものである。該ヒト SGLT ホモログの発現分布はヒト SGLT1, 2 と異なり、膀胱、肝臓でもっとも発現が高く、該ラット SGLT ホモログは腎臓で発現が高く、ラット SGLT ホモログは平滑筋および管臓で発現が高い。

15 SGLT ホモログを賦活化する方法としては、例えば SGLT ホモログのプロモーターを活性化したり、mRNA を安定化することで発現レベルを亢進することが考えられる。また、SGLT ホモログを細胞内から膜表面に移行し、細胞膜上で機能する SGLT ホモログの数を増やすことも考えられる。

20 本発明者は、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、
(1) 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、
(2) 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列を含有する前記（1）項記載のタンパク質またはその塩、
(3) 配列番号：1 または配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

(4) 配列番号：1 または配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列を含有する前記（3）項記載のタンパク質またはその塩、
(5) 前記（1）項記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、
(6) 前記（3）項記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、
(7) 前記（1）項記載のタンパク質または前記（5）項記載の部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA、
(8) 前記（3）項記載のタンパク質または前記（6）項記載の部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA、
(9) 配列番号：2 で表わされる塩基配列を有する前記（7）項記載のDNA、
(10) 配列番号：7 で表わされる塩基配列を有する前記（7）項記載のDNA、
(11) 配列番号：1 6 または配列番号：2 7 で表わされる塩基配列を有する前記（8）項記載のDNA、
(12) 前記（7）項記載のDNAを含有する組換えベクター、
(13) 前記（8）項記載のDNAを含有する組換えベクター、
(14) 前記（12）項記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、
(15) 前記（13）項記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、
(16) 前記（14）項記載の形質転換体を培養し、前記（1）項記載のタンパク質または前記（5）項記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする前記（1）項記載のタンパク質もしくは前記（6）項記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法、
(17) 前記（15）項記載の形質転換体を培養し、前記（3）項記載のタンパク質または前記（6）項記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする前記（3）項記載のタンパク質もしくは前記（6）項記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法、
(18) 前記（1）項記載のタンパク質もしくは前記（5）項記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、
(19) 前記（3）項記載のタンパク質もしくは前記（6）項記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、
(20) 前記（7）項記載のDNAを含有してなる医薬、

5.

- (2 1) 前記 (8) 項記載のDNAを含有してなる医薬、
 (2 2) 前記 (1) 項または前記 (3) 項記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドもしくは前記 (5) 項または前記 (6) 項記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドまたは前記 (1) 項記載のスクリーニング方法または前記 (2 9) 項記載のスクリーニング用キット、
 5 含有することを特徴とする診断剤、
 (2 3) 前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、
 (2 4) 前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、
 10 (2 5) 前記 (2 3) 項または前記 (2 4) 項記載の抗体を含有することを特徴とする診断剤、
 (2 6) 前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
 15 前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
 (2 7) 前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
 20 前記 (7) 項または前記 (8) 項記載のDNAのプロモーター下流にレバーター遺伝子を挿入したDNAを含有する組換えベクターで形質転換させた形質転換体を用いることを特徴とする、前記 (1) 項もしくは前記 (3) 項記載のタンパク質または前記 (5) 項もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドの発現を促進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
 (2 8) 前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
 25 (2 9) 前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
 (3 0) 前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチド

6.

- またはその塩を含有してなる、前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
 (3 1) 前記 (2 6) 項記載のスクリーニング方法または前記 (2 9) 項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、
 (3 2) 前記 (2 7) 項記載のスクリーニング方法または前記 (3 0) 項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、
 (3 3) 前記 (2 6) 項記載のスクリーニング方法または前記 (2 9) 項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、
 15 (3 4) 前記 (2 7) 項記載のスクリーニング方法または前記 (3 0) 項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、
 (3 5) 前記 (2 6) 項記載のスクリーニング方法または前記 (2 9) 項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる医薬、
 (3 6) 前記 (2 7) 項記載のスクリーニング方法または前記 (3 0) 項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる医薬、
 (3 7) 前記 (2 6) 項記載のスクリーニング方法または前記 (2 9) 項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前

(6.8) さらに、配列番号：2、配列番号：1.6、配列番号：2.7または配列番号：5.1で表される塩基配列を含有するDNAまたはその一部を含有する前記（6.7）項記載の診断剤、

(6.9) 糖尿病または高脂血症の診断剤である前記（6.7）項記載の診断剤、

5 (7.0) 前記（5.2）項または前記（5.7）項記載の一塩基多型（SNP s）体を解析することを特徴とする糖尿病または高脂血症の診断方法などを提供する。

図面の簡単な説明

1) 図1 ヒトSGLTホモログの疎水性プロット図を示す。

2) 図2 ヒトSGLTホモログの各種組織における発現分布の解析結果を示す。

MTC/バネルは発現量を標準化したcDNA (clontech 社製) を示す。

3) 図3 ヒトSGLTホモログ、hSGLT1およびhSGLT2の α -Methyl Glucoseの取り込み活性の測定結果を示す。

4) マウスSGLTホモログの疎水性プロット図を示す。

5) 図5 マウスSGLTホモログの各種組織における発現分布の解析結果を示す(左図は雄、右図は雌を示す)。MTC/バネルは発現量を標準化したcDNA (clontech 社製) を示す。

6) 図6 マウスSGLTホモログ、hSGLT1およびhSGLT2の α -Methyl Glucoseの取り込み活性の測定結果を示す。

7) 図7 ラットSGLTホモログの疎水性プロット図を示す。

8) 図8 ラットSGLTホモログの各種組織における発現分布の解析結果を示す。MTC/バネルは発現量を標準化したcDNA (clontech 社製) を示す。

9) 図9 ラットSGLTホモログ、hSGLT1およびhSGLT2の α -Methyl Glucoseの取り込み活性の測定結果を示す。

10) 図10 抗ヒトSGLTホモログペプチド抗体によるウエスタンプローティングの結果を示す。

11) 図11 ヒトSGLTホモログ構造遺伝子に存在するSNPを示す。

12) pME18S vector 導入COS-7細胞 (ICL) の摂取り込み量を1としたときのSNPを有するヒトSGLTホモログ発現細胞の摂取り込み活性の値のグラフを示す。

図13 ヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域に存在するSNPを示す。

図14 ヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域の欠失変異体を示す。

図15 シーバンシー・ルシフエラーゼ活性を1としたときのヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域におけるプロモーター活性の値のグラフを示す。

図16 健常人におけるヒトSGLTホモログのSNP座現頻度を表すグラフを示す(平均年齢42.3歳、n=58)。SNP-P1についてはCをmajor、Tをminorとする。SNP-P2についてはGをmajor、Tをminorとする。SNP-C1についてはGをmajor、Aをminorとする。SNP-C2についてはGをmajor、Tをminorとする。SNP-C3についてはGをmajor、Tをminorとする。

本発明で用いられる配列番号：1、配列番号：1.5および配列番号：2.6で記述されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質(以下、本発明のタンパク質または本発明で用いられるタンパク質と称することもある)は、ヒトや温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞(例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、骨髄細胞、骨髓細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンセン細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、嫌細芽細胞、纖維細胞、

筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、单球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織(例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脑皮質、延髓、小脳)、脊髓、下垂体、胃、胰腺、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨盤、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、頸下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巢、胎盤、子宫、骨、関節、骨骼筋など)に由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であつてもよい。

配列番号：1、配列番号：1.5および配列番号：2.6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1、配列番号：1.5および配列

番号：2.6で表わされるアミノ酸配列と約6.0%以上、好ましくは約7.0%以上；より好ましくは約8.0%以上、特に好ましくは約9.0%以上、最も好ましくは約9.5%以上の相同事性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：1、配列番号：1.5および配列番号：2.6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1、配列番号：1.5および配列番号：2.6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1、配列番号：1.5および配列番号：2.6で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、グルコースの能動輸送活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、グルコースの能動輸送活性が同等（例、

約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは0.5～2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

グルコースの能動輸送活性などの活性の測定は、公知の方法に準じて行うことが出来るが、例えば、Cloning and functional expression of an SGLT-1-like protein from the Xenopus laevis intestine (Am. J. Physiol., 276: G1251-G1259, 1999)に記載の方法またはそれに準じる方法に従つて測定することができる。

また、本発明で用いられるタンパク質としては、例えば、①配列番号：1、配列番号：1.5または配列番号：2.6で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(好

まじくは、1~30歳程度、好まじくは

6 で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1～30個程度、
好ましくは1～10個程度、さらによくは数(1～5)個)のアミノ酸が他の
アミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列
を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

7 前記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、
欠失または置換の位置は、とくに限定されない。

8 本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標配の慣例に従って左端がN末端(ア
ミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号：1、配列番号：
9 15または配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじ
めとする、本発明で用いられるタンパク質は、C末端がカルボキシル基(-COO
H)、カルボキシレート(-COO-)、アミド(-CONH₂)またはエステル(-
COOR)の何れであつてもよい。

10 ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-ブロピル、
イソブロピル、n-ブチルなどのC₁-₄アルキル基、例えば、シクロヘンチル、シ
クロヘキシルなどのC₈-₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、α-ナフチルな
どのC₆-₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁-₂
アルキル基もしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C₁-₂アルキル基
などのC₇-₁₄アラルキル基、ビパロイルオキシメチル基などが用いられる。

11 本発明で用いられるタンパク質がC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキ
シレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されて
いるものも本発明で用いられるタンパク質に含まれる。この場合のエステルとして
は、例えば前記したC末端のエステルなどが用いられる。

12 さらに、本発明で用いられるタンパク質には、N末端のアミノ酸残基(例、メチ
オニン残基)のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、セセル基などのC₁-₆
アルカノイルなどのC₁-₆アシル基など)で保護されているもの、生体内で切断さ
れて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のア
ミノ酸の側鎖上の置換基(例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、イ
ンドール基、アニシノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル
基などのC₁-₆アルカノイル基などのC₁-₆アシル基など)で保護されているもの、

あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明で用いられるタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するヒト肺臘由來のタンパク質、配列番号：1.5で表されるアミノ酸配列を含有するマウス腎臘由來のタンパク質および配列番号：2.6で表されるアミノ酸配列を含有するラット腎臘由來のタンパク質などがあげられる。本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様の性質を有するものであればよい。

10 例えば、本発明で用いられるタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、最も好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

また、本発明で用いられる部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

本発明の部分ペプチドとしては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において例えば第176番目～201番目、第471番目～491番目のアミノ酸配列を含有するペプチドが好ましい。配列番号：15で表されるアミノ酸配列において例えば第172番目～197番目、第467番目～487番目のアミノ酸配列を好ましい。配列番号：26で表されるアミノ酸配列において例えば第175番目～200番目、第470番目～490番目のアミノ酸配列を好ましい。

また、本発明で用いられる部分ペプチドはC末端が、カルボキシル基（-COOH）

H）、カルボキシレート（-COO⁻）、アミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）のいずれであってもよい。

さらに、本発明で用いられる部分ペプチドには、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様に、C末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有しているもの、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がヒログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているものの、あるいは糖鎖が結合したいかゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

10 本発明で用いられる部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。

たとえば、後述する本発明の抗体を調製する目的には、例えば配列番号：1で表されるアミノ酸配列において第261～275番目、第399～417番目、第500～549番目のアミノ酸配列を含有するペプチドなどがあげられる。配列番号：15で表されるアミノ酸配列において第257～271番目、第395～413番目、第496～545番目のアミノ酸配列を含有するペプチドなどがあげられる。配列番号：26で表されるアミノ酸配列において第260～274番目、第398～416番目、第499～648番目のアミノ酸配列を含有するペプチドなどがあげられる。

本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理的に許容される塩（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属）などとの塩が用いられ、とりわけ生理的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リノ酸、堿酸、奥化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、甘酸、プロピオノ酸、マル酸、マレイノ酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リノゴ酸、蔥酸、安息香酸、メタノルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

20 本発明で用いられるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から公知のタンパク質の解剖方法によつて製造することもできるし、タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準

じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルゴール樹脂、4-メチルベンジスヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリラルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニルヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Rmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、公知の各種結合方法に従い、樹脂上で結合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内シスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

前記した保護アミノ酸の総合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボキシミド類がよい。カルボキシミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボキシミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノ)プロリル)カルボキシミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBt、HOOb)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルとしてはHOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との総合に用いられる溶媒としては、タンパク質総合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択される。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの疎水性アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、

- トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ビリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られていてる範囲から適宜選択され、通常約20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、総合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な総合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な総合が得られないときは、無水酢酸またはアセチルミドソールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようになることができる。
- 原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペニチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、CI-L、Br-L、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。
- カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化(例えば、メチル、エチル、ブロビル、ブチル、t-ブチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロオクタデカル、2-アダマンチルなどの直錐状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)、アラルキルエステル化(例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドライド化、t-ブトキシカルボニルヒドライド化などによって保護することができます。
- セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができます。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級(C₁～₆)アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、

タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別 の方法としては、例えば、ま
ず、カルボキシ末端アミノ酸のα-カルボキシル基を所望の鎖長まで延ばした後、ア
ミノ基側にペプチド(タンパク質)鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖
のN末端のα-アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドと
C末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチド
とを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを前記したような混合溶媒中で結
合させる。結合反応の詳細については前記と同様である。結合により得られた保護
タンパク質またはペプチドを精製した後、前記方法によりすべての保護基を除去し、
所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質または
ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥すること
で所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。

タンパク質またはペプチドのエスチル体を得るには、例えば、カルボキシ末端ア
ミノ酸のα-カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルと
した後、タンパク質またはペプチドのエスチル体を得ることができる。

本発明で用いられる部分ペプチドまたはそれらの塩は、公知のペプチドの合成法
に従つて、あるいは本発明で用いられるタンパク質を適当なペプチダーゼで切断す
ることによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相
合成法、液相合成法のいずれによつても良い。すなわち、本発明で用いられる部分
ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを結合させ、生
成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造
することができる。公知の結合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～
⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M. A. Ondetti, "Peptide Synthesis (Peptide Synthesis),
Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLueke, "The Peptide", Academic Press, New York
(1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および柳原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV, 205, (1977

年)

⑤矢島治明監修、統医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店
また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフ
イー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明で用いられる部
分ペプチドを精製単離することができる。前記方法で得られる部分ペプチドが遊離
体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適當な塩に変換す
ることができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方
法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAとしては、前述した本発明で
用いられるタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるも
のであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細
胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成
DNAのいずれでもよい。

ライブライアに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミ
ド、ファージミドなどいずれであつてもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal
RNAまたはmRNA画分を標的したものを利用して直接Reverse Transcriptase
Polymerase Chain Reaction(以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅する
こともできる。

本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番
号：2、配列番号：7、配列番号：16または配列番号：27で表される塩基配列
を含有するDNA、または配列番号：2、配列番号：7、配列番号：16または配
列番号：27で表される塩基配列とハイストリシンジェント条件下でハイブリダイ
ズする塩基配列を有し、本発明で用いられるタンパク質と実質的に同質の性質を有
するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：2で表される塩基配列とハイストリシンジェント条件下でハイブリダ
イズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2で表される塩基配列と約50%
以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは
約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同
性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

20.

- 配列番号：7で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：7で表される塩基配列と約60%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。
- 配列番号：1.6で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：1.6で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。
- 配列番号：2.7で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2.7で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。
- ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従つて行なうことができる。また、市販のライブラーーを適用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従つて行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従つて行なうことができる。
- ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約1.9～4.0mM、好ましくは約1.9～2.0mMで、温度が約5～7°C、最も好ましくは約6.0～6.5°Cの条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約1.9mMで温度が約6.5°Cの場合が最も好ましい。
- より具体的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：2または配列番号：7で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、配列番号：1.5で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：1.6で表される塩基配列

21.

- を含有するDNAなどが用いられ、配列番号：2.6で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：2.7で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。
- 本発明で用いられる部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明で用いられる部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであつてもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムcDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー合成DNAのいずれでもよい。
- 本発明で用いられる部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：7、配列番号：1.6または配列番号：2.7で表される塩基配列を有するDNAの一部分を有するDNA、または配列番号：2、配列番号：7、配列番号：1.6または配列番号：2.7で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同様の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を含有するDNAなどが用いられる。
- 配列番号：2、配列番号：7、配列番号：1.6または配列番号：2.7で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。
- ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。
- 配列番号：2、配列番号：7、配列番号：1.6または配列番号：2.7で表される塩基配列とハイブリダイゼーションの方法としては、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従つて行なうことができる。
- 本発明のタンパク質をコードするDNAの一塩基多型 (SNPs) 体としては、例えば、配列番号：2、配列番号：1.6または配列番号：2.7で表される塩基配列を含有するDNAの一塩基多型 (SNPs) 体などが用いられ、具体的には、配列番号：4.0、配列番号：4.2または配列番号：4.5で表される塩基配列を含有する一塩基多型 (SNPs) 体などが用いられる。
- 本発明の一塩基多型 (SNPs) 体にコードされるタンパク質としては、具体的には、配列番号：4.1、配列番号：4.3または配列番号：4.6で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などが用いられる。
- 本発明のタンパク質をコードするDNAに対するプロモーターとしては、例えば、配列番号：5.1で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明の配列番号：5.1で表される塩基配列を含有するDNAの一塩基多型（SNPs）体としては、例えば、配列番号：5.4、配列番号：5.5または配列番号：5.6で表される塩基配列を含有する一塩基多型（SNPs）体などが用いられる。本発明で用いられるタンパク質、部分ペプチド（以下、これらをコードするDNA Aのクローニングおよび発現の駆動においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNA（一塩基多型（SNPs）体も含む）のクローニングの手段としては、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（molecular Cloning）2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従つて行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従つて行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km^r（宝酒造（株））、MutanTM-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法やGapped duplex法やKunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従つて行なうことができる。

クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができます。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適當な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、（ロ）該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR 322, pBR 325, pUC12, pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110, pTP5, pC194）、酵母由来のプラスミド（例、pSH19, pSH15）、ヘファーシなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニーアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11, pXT1, pRC/CMV, pRC/RSV, pCDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対する適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-tkプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシエリヒア属である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP_Lプロモーター、λP_Pプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、pEPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スライシングシグナル、ポリア付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40 oriと略称する場合がある）などを含有しているものも用いることができる。

選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhrと略称する場合がある）遺伝子（メソトレキセート（MTX）耐性）、アンシリシン耐性遺伝子（以下、Am^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Ne^rと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、dhr遺伝子欠損チャニアースムスター細胞を用いてdhr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN端末側に付加する。宿主がエシエリヒア属である場合は、PhoA・シグナル配列、

- OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、M F α ・シグナル配列、SUC 2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。
- このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができます。
-) 10 エシエリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシエリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1 (プローシーシングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーワスキー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 60巻, 160 (1968)), JM103 (スクレイク・アッシュ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309 (1981)), JA221 (ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517 (1978)), HB101 (ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459 (1969)), C600 (ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440 (1954))などが用いられる。
-) 15 バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) M1114 (シーン, 24巻, 265 (1983)), 207-21 (ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87 (1984))などが用いられる。
-) 20 酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, 20B - 12、シソサッカロマイセス ボンベ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC 1913, NCYC2036、ピキア バストリス (Pichia pastoris) KM71 などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがACNPVの場合は、夜盃蟲の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由

来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh FiveTM細胞、Mamestra brassicae 由來の細胞またはBombyx mori N 細胞；BmN細胞などが用いられる。ウイルスがBm NPVの場合は、蚕由來株化細胞 (Bombyx mori N 細胞；BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・バイボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977))などが用いられる。

昆蟲としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる (前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592 (1985))。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャニースハムスマスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャニースハムスマスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr⁻) 細胞と略記), マウスL細胞, マウスAT-T-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

) 10 エシエリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プローシーシングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーワスキー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 69巻, 2110 (1972) やジーン (Gene), 1 7巻, 107 (1982)などに記載の方法に従つて行なうことができる。

) 15 パチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジエネティックス (Molecular & General Genetics), 1 6巻, 111 (1979)などに記載の方法に従つて行なうことができる。

) 20 酵母を形質転換するには、例えば、メツズ・イン・エンザイモロジー (Methods In Enzymology), 1 94巻, 182-187 (1991)、ブローシングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーワスキー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 75巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従つて行なうことができる。

昆蟲細胞または昆蟲を形質転換するには、例えば、バイオノテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-56 (1988) などに記載の方法に従つて行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロト

コール、2 6 3 - 2 6 7 (1 9 9 5) (秀闘社発行)、ヴィロロジー (Virology), 5 2 卷, 4 5 6 (1 9 7 3) に記載の方法に従つて行なうことができる。
このようにして、タンパク質をコードする DNA を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができます。

5 宿主がエシエリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せらる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスターブ・リカ―、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、パライシヨ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどを挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地の pH は約 5 ~ 8 が望ましい。

エシエリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カゼイン、酸を含む M 9 培地 (ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イシン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 4 3 1 - 4 3 3, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1 9 7 2) が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働きかせるために、例えば、3 β-インドリラクリル酸のような酵剤を加えることができる。

20 宿主がエシエリヒア属菌の場合、培養は通常約 1.5 ~ 4.3 ℃ で約 3 ~ 24 時間行ない、必要により、通気や搅拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約 3.0 ~ 4.0 ℃ で約 6 ~ 24 時間行ない、必要により通気や搅拌を加えることもできる。
宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、パークホールダー (Burkholder) 最小培地 (Bostian, K. L. ら、ブローシンゲンズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユー・エス・エー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 77 卷, 4 5 0 5 (1 9 8 0)) や 0.5% カゼイノ酸を含有する SD 培地 (Bitter, G. A. ら、ブローシンゲンズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユー・エス・エー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 77 卷, 4 5 0 5 (1 9 8 0)) が適宜用いられる。培養液の中に尿素や塩酸アミニンなどのタンパク質が含まれている場合、界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それが公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上

- Sci. U.S.A.), 81 卷, 5 3 3 0 (1 9 8 4) が挙げられる。培地の pH は約 5 ~ 8 に調整するのが好ましい。培養は通常約 20 ℃ ~ 3 5 ℃ で約 24 ~ 72 時間行ない、必要に応じて通気や搅拌を加える。
宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C. ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した 1.0% ワシ油等の添加物を適量加えたものなどが用いられる。培地の pH は約 6. 2 ~ 6. 4 に調整するのが好ましい。培養は通常約 27 ℃ で約 3 ~ 5 日間行ない、必要に応じて通気や搅拌を加える。
宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 5 ~ 10 2.0% の胎児牛血清を含む MEM 培地 (サイエンス (Science), 1 2 2 卷, 5 0 1 (1 9 5 2)), DMEM 培地 (ヴィロロジー (Virology), 8 卷, 3 9 6 (1 9 5 9)), RPMI 1 6 4 0 培地 (ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 1 9 9 卷, 5 1 9 (1 9 6 7)), 1 9 9 培地 (ブローシンゲンズ・オブ・ザ・サイエンティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73 卷, 1 (1 9 5 0)) などが用いられる。pH は約 6 ~ 8 であるのが好ましい。培養は通常約 30 ℃ ~ 40 ℃ で約 1.5 ~ 6.0 時間行ない、必要に応じて通気や搅拌を加える。
以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。
前記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。
本発明のタンパク質を培養菌あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リソチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸アミニンなどのタンパク質活性剤や、トリントン X-1 0 0 ℗などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それが公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上

消を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈殿法などの溶解度を利用する方法、透析法、膜外ろ過法、ゲルろ過法、および SDS-PAGE アクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティーコロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

- 10 かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。
 - 15 なお、粗挽え体が產生するタンパク質を、精製前または精製後に適當なタンパク修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ガリベブチドを部分的に除去することもできる。タンパク修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。
 - 20 かくして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザyme ムノツセイやウエスタン blottingなどにより測定することができる。
- 本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。
- 25 本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

[モノクローナル抗体の作製]

(a) モノクローナル抗体產生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれが自体あるいは粗体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロントアジュバントや不完全フロントアジュバントを投与してもよい。投与は通常 2 ～ 6 週間に 1 回ずつ、計 2 ～ 10 回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イス、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

- 5 モノクローナル抗体產生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体血清の認められた個体を選択し最終免疫の 2 ～ 5 日後に脾臓またはリノン節を探取し、それらに含まれる抗体產生細胞を同種または異種動物の骨髓細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体產生ハイブリドーマを醸製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の凝胶阻害タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラー・ミルスタンの方法（ネイチャー（Nature）、256、495 (1975)）に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくは PEG が用いられる。
- 10 骨髓細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1など温血動物の骨髓細胞が挙げられるが、P3U1 が好ましく用いられる。用いられる抗体產生細胞（骨髓細胞）数と骨髓細胞数との好ましい比率は 1 : 1 ～ 20 :
- 15 1 度であり、PEG（好ましくは PEG 1000 ～ PEG 6000）が 1.0 ～ 8.0 % 程度の濃度で添加され、2.0 ～ 4.0 ℃、好ましくは 3.0 ～ 3.7 ℃ で 1 ～ 10 分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。
- 20 モノクローナル抗体產生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは粗体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテイン A を加え、固

相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはブロテインAを吸着させた固相にハイドロマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

5) モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従つて行なうことができる。通常HAT(ヒポサンチン、アミノブテリン、チミシン)を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイドロマーが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～2 %、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含む RPMI 1640培地、1～10 %の牛胎児血清を含む GIT培地(和光純薬工業(株))あるいはハイドローマ培養用無血清培地(SFM-101、日本製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイドロマ培養上清の抗体価は、前記の抗血清中の中抗体価の測定と同様にして測定できる。

(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法(例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体(例、DEAE)による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを探取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法)に従つて行なうことができる。

(ポリクローナル抗体の作製)

本発明のポリクローナル抗体は、それ公知あるいはそれに準じる方法に従つて製造することができます。例えば、免疫抗原(タンパク質抗原)自身、あるいはそれと同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を探取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができます。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアータンパク質との複合体に關し、キャリアータンパク質の種類およびキャリアーとハブテンとの混合比

は、キャリアーに架橋させて免疫したハブテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血管アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアン等を重量比でハブテン1に対し、約0.1～2.0、好ましくは約1～5の割合でカプセル化する方法が用いられる。

6) また、ハブテンとキャリアーのカブリングには、種々の結合剤を用いることがができるが、グルタルアルdehyドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

結合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは抗体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全抗体、不完全抗体アジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

10) ポリクローナル抗体は、前記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、前記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製法は、前記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従つて行なうことができる。

15) 本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA(以下、アンセンススクレオチド)の説明においては、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある)の塩基配列に相補的な塩基配列を有するアンセンススクレオチドとしては、本発明のDNAの塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンセンススクレオチドであってもよいが、アンセンスDNAが好ましい。

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列(すなわち、本発明のDNAの相補鎖)の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列(例えば、開始コドン付近の塩基配列など)の相補鎖と約

70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスヌクレオチドが好適である。

具体的には、配列番号：2、配列番号：7、配列番号：16または配列番号：27で表される塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に

相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：2、配列番号：7、配列番号：16または配列番号：27で表される塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部を有するアンチセンスヌクレオチドなどが挙げられる。

アンチセンスヌクレオチドは通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。

ヌクレオセなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスDNAを構成する各ヌクレオチドのりん酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホチオエート、メチルホスホネート、ホスホジチオネートなどの化学修飾りん酸残基に置換されてもよい。これらのアンチセンスヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができます。

以下に、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、および本発明のDNAのアンチセンスヌクレオチド（以下、本発明のアンチセンスヌクレオチドと略記する場合がある）の用途を説明する。

配列番号：1で表されるタンパク質（以下、ヒトSGLTホモログタンパク質と表記する場合がある）はヒトの肺臓、肝臓において組織特異的に高発現するので、例えば糖尿病などの疾患マーカーとして利用することが出来る。すなわち、糖尿病における早期診断、症状の重症度の判定、疾患進行の予測のためのマークとして有用である。

マウスSGLTホモログタンパク質（以下、ラットSGLTホモログタンパク質と表記する場合がある）はラットの肺臓において組織特異的に高発現するので、例えば糖尿病などの疾患マーカーとして利用することが出来る。すなわち、糖尿病における早期診断、症状の重症度の判定、疾患進行の予測のためのマークとして有用である。

ラットSGLTホモログタンパク質（以下、ヒトSGLTホモログタンパク質と表記する場合がある）はヒトの肺臓、肝臓への糖取り込みを抑制することで血糖を下げる所以である。

- から肝臓への糖取り込みを促進し肝臓から血中への糖放出を抑制することができるので例えば、糖尿病などの治療・予防剤として使用することができる。
 一方、ヒトSGLTホモログタンパクの活性を阻害する化合物もしくはその塩を含有する医薬は、腎臓からの糖の再吸収を抑制することで血糖を下げる所以でき、（糖尿病）肝臓への糖取り込みを抑制することで脂肪合成を抑制する所以があるので、例えば、高脂血症などの治療・予防剤として使用することができる。
 配列番号：1～5で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、マウスSGLTホモログタンパクと表記する）はマウスの腎臓において組織特異的に高発現するので、例えば糖尿病などの疾患マーカーとして利用することが出来る。すなわち、高脂血症における早期診断、症状の重症度の判定、疾患進行の予測のためのマークとして有用である。
 マウスSGLTホモログタンパクの活性を阻害する化合物もしくはその塩を含有する医薬は、腎臓からの糖の再吸収を抑制することで血糖を下げる所以でき、（糖尿病）肝臓への糖取り込みを抑制することで脂肪合成を抑制する所以があるので、例えば高脂血症などの治療・予防剤として使用することができる。
 配列番号：2～6で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、ラットSGLTホモログタンパクと表記する）はラットの腎臓において組織特異的に高発現するので、例えば糖尿病などの疾患マーカーとして利用することが出来る。すなわち、高脂血症における早期診断、症状の重症度の判定、疾患進行の予測のためのマークとして有用である。
 ラットSGLTホモログタンパクの活性を阻害する化合物もしくはその塩を含有する医薬は、腎臓からの糖の再吸収を抑制することで血糖を下げる所以でき、（糖尿病）肝臓への糖取り込みを抑制することで脂肪合成を抑制する所以があるので、例えば、高脂血症などの治療・予防剤として使用することができる。
 〔1〕本発明のタンパク質が関与する各種疾病的治療・予防剤
 本発明のタンパク質は、Na⁺/グルコーストランスポーターとしてグルコースの能動輸送活性を有し、肺巨細胞への糖取り込み、血糖値依存性のインスリン分泌に寄与している。また、肝細胞においては、細胞内外のグルコース濃度勾配に関わらず血中から肝臓への糖取り込みに寄与している。

したがって、本発明のタンパク質をコードするDNAに異常があつたり、欠損している場合には、本発明のタンパク質の発現量が減少している場合には、例えば、糖尿病などの種々の疾患が発症する。

したがって、本発明のタンパク質および本発明のDNAは、例えば、糖尿病などの疾患の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

5 例えば、生体内において本発明のタンパク質が減少あるいは欠損しているために、グルコースの肺β細胞への攝取り込み、肝細胞への糖取り込みが十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、(イ) 本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のタンパク質を発現させることによって、(ロ) 細胞に本発明のDNAを導入し、本発明のタンパク質を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または、(ハ) 本発明のタンパク質を該患者に投与することなどによつて、該患者における本発明のタンパク質の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを前記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを单独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、エーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに導入した後、常套手段に従つて、ヒトまたは温血動物に投与することができます。本発明のDNAは、そのままで、あるいは採取促進のための補助剤などの生理学的に認められる粗体とともに製剤化し、遺伝子錠やハイドロゲルカルテールのようなカテーテルによって投与できる。

15 本発明のタンパク質を前記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらには好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

本発明のタンパク質等は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質等を生理的に認められる粗体、香料剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られ

- るようにするものである。
- 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスター、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスター、アルギン酸などのような膨化剤、
- 5 ステアリン酸マグネシウムのような香料剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液体状粗体を含有することができます。注射のための無菌粗成物は注射用水のまゝうなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させなどの通常の製剤実施に従つて処方することができる。
- 10 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の醣類を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適當な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ボリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80™、HCO-50など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適當なアンプルに充填される。
- 本発明のDNAが挿入されたベクターも前記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。
- 25 このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、温血動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イス、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができます。とりわけ、ヒトに対して投与するのが好ましい。
- 本発明のタンパク質等の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより

差異はあるが、例えば、糖尿病の治療目的で本発明のタンパク質等を経口投与する場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき該タンパク質等を約0.1 mg～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。非経口的に投与する場合は、該タンパク質等の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、糖尿病の治療目的で本発明のタンパク質等を注射剤の形で成人（体重60 kgとして）に投与する場合、一日につき該タンパク質等を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を皮下部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

〔2〕疾患に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物、またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、

(1) 本発明のタンパク質を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の活性（例えば、グルコースの能動輸送活性など）を促進または阻害する化合物またはその塩（以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

(2) (1) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞の糖取り込み活性と(1i) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の糖取り込み活性の比較を行なうことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

具体的には、前記スクリーニング方法においては、例えば、(1)と(1i)の場合において、糖取り込み活性を粗標識したグルコースまたは2-deoxy-glucoseなどのグルコース類似体の細胞内への蓄積を放射活性で測定し、グルコースの能動輸送活性の指標として比較することを特徴とするものである。

本発明のスクリーニングにおいては、タンパク質を産生する能力を有する細胞に、

すなわち、本発明は

(1) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞に、粗標識したグルコースまたは粗標識したグルコース類似体を取り込ませると同時もしくは取り込ませる前に、グルコースの能動輸送活性阻害剤を添加した場合と、(1i) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞に、粗標識したグルコースまたは粗標識したグルコース類似体を取り込ませると同時にもしくは取り込ませる前に、グルコースの能動輸送活性阻害剤または阻害剤、および試験化合物を添加した場合とを比較し、その取り込み量の変化を測定することを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、免醉生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられる。これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。前記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリノ酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質のN^α-イオンチャネル活性を阻害しないバッファーであればよい。

本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換細胞）が用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現させた形質転換細胞が好ましく用いられる。

本発明のタンパク質のグルコースの能動輸送活性は、公知の方法、例えば、Cloning and functional expression of an SCLT-1-like protein from the Xenopus laevis intestine (Am. J. Physiol. 276: G1251-G1259, 1999)に記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って測定することができます。

例えば、前記(1i)の場合におけるグルコースの能動輸送活性を、前記(1)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその

6) 10) 15) 20) 25) 30) 35) 40) 45) 50) 55) 60) 65) 70) 75) 80) 85) 90) 95) 100) 105) 110) 115) 120) 125) 130) 135) 140) 145) 150) 155) 160) 165) 170) 175) 180) 185) 190) 195) 200) 205) 210) 215) 220) 225) 230) 235) 240) 245) 250) 255) 260) 265) 270) 275) 280) 285) 290) 295) 300) 305) 310) 315) 320) 325) 330) 335) 340) 345) 350) 355) 360) 365) 370) 375) 380) 385) 390) 395) 400) 405) 410) 415) 420) 425) 430) 435) 440) 445) 450) 455) 460) 465) 470) 475) 480) 485) 490) 495) 500) 505) 510) 515) 520) 525) 530) 535) 540) 545) 550) 555) 560) 565) 570) 575) 580) 585) 590) 595) 600) 605) 610) 615) 620) 625) 630) 635) 640) 645) 650) 655) 660) 665) 670) 675) 680) 685) 690) 695) 700) 705) 710) 715) 720) 725) 730) 735) 740) 745) 750) 755) 760) 765) 770) 775) 780) 785) 790) 795) 800) 805) 810) 815) 820) 825) 830) 835) 840) 845) 850) 855) 860) 865) 870) 875) 880) 885) 890) 895) 900) 905) 910) 915) 920) 925) 930) 935) 940) 945) 950) 955) 960) 965) 970) 975) 980) 985) 990) 995) 1000) 1005) 1010) 1015) 1020) 1025) 1030) 1035) 1040) 1045) 1050) 1055) 1060) 1065) 1070) 1075) 1080) 1085) 1090) 1095) 1100) 1105) 1110) 1115) 1120) 1125) 1130) 1135) 1140) 1145) 1150) 1155) 1160) 1165) 1170) 1175) 1180) 1185) 1190) 1195) 1200) 1205) 1210) 1215) 1220) 1225) 1230) 1235) 1240) 1245) 1250) 1255) 1260) 1265) 1270) 1275) 1280) 1285) 1290) 1295) 1300) 1305) 1310) 1315) 1320) 1325) 1330) 1335) 1340) 1345) 1350) 1355) 1360) 1365) 1370) 1375) 1380) 1385) 1390) 1395) 1400) 1405) 1410) 1415) 1420) 1425) 1430) 1435) 1440) 1445) 1450) 1455) 1460) 1465) 1470) 1475) 1480) 1485) 1490) 1495) 1500) 1505) 1510) 1515) 1520) 1525) 1530) 1535) 1540) 1545) 1550) 1555) 1560) 1565) 1570) 1575) 1580) 1585) 1590) 1595) 1600) 1605) 1610) 1615) 1620) 1625) 1630) 1635) 1640) 1645) 1650) 1655) 1660) 1665) 1670) 1675) 1680) 1685) 1690) 1695) 1700) 1705) 1710) 1715) 1720) 1725) 1730) 1735) 1740) 1745) 1750) 1755) 1760) 1765) 1770) 1775) 1780) 1785) 1790) 1795) 1800) 1805) 1810) 1815) 1820) 1825) 1830) 1835) 1840) 1845) 1850) 1855) 1860) 1865) 1870) 1875) 1880) 1885) 1890) 1895) 1900) 1905) 1910) 1915) 1920) 1925) 1930) 1935) 1940) 1945) 1950) 1955) 1960) 1965) 1970) 1975) 1980) 1985) 1990) 1995) 2000) 2005) 2010) 2015) 2020) 2025) 2030) 2035) 2040) 2045) 2050) 2055) 2060) 2065) 2070) 2075) 2080) 2085) 2090) 2095) 2100) 2105) 2110) 2115) 2120) 2125) 2130) 2135) 2140) 2145) 2150) 2155) 2160) 2165) 2170) 2175) 2180) 2185) 2190) 2195) 2200) 2205) 2210) 2215) 2220) 2225) 2230) 2235) 2240) 2245) 2250) 2255) 2260) 2265) 2270) 2275) 2280) 2285) 2290) 2295) 2300) 2305) 2310) 2315) 2320) 2325) 2330) 2335) 2340) 2345) 2350) 2355) 2360) 2365) 2370) 2375) 2380) 2385) 2390) 2395) 2400) 2405) 2410) 2415) 2420) 2425) 2430) 2435) 2440) 2445) 2450) 2455) 2460) 2465) 2470) 2475) 2480) 2485) 2490) 2495) 2500) 2505) 2510) 2515) 2520) 2525) 2530) 2535) 2540) 2545) 2550) 2555) 2560) 2565) 2570) 2575) 2580) 2585) 2590) 2595) 2600) 2605) 2610) 2615) 2620) 2625) 2630) 2635) 2640) 2645) 2650) 2655) 2660) 2665) 2670) 2675) 2680) 2685) 2690) 2695) 2700) 2705) 2710) 2715) 2720) 2725) 2730) 2735) 2740) 2745) 2750) 2755) 2760) 2765) 2770) 2775) 2780) 2785) 2790) 2795) 2800) 2805) 2810) 2815) 2820) 2825) 2830) 2835) 2840) 2845) 2850) 2855) 2860) 2865) 2870) 2875) 2880) 2885) 2890) 2895) 2900) 2905) 2910) 2915) 2920) 2925) 2930) 2935) 2940) 2945) 2950) 2955) 2960) 2965) 2970) 2975) 2980) 2985) 2990) 2995) 3000) 3005) 3010) 3015) 3020) 3025) 3030) 3035) 3040) 3045) 3050) 3055) 3060) 3065) 3070) 3075) 3080) 3085) 3090) 3095) 3100) 3105) 3110) 3115) 3120) 3125) 3130) 3135) 3140) 3145) 3150) 3155) 3160) 3165) 3170) 3175) 3180) 3185) 3190) 3195) 3200) 3205) 3210) 3215) 3220) 3225) 3230) 3235) 3240) 3245) 3250) 3255) 3260) 3265) 3270) 3275) 3280) 3285) 3290) 3295) 3300) 3305) 3310) 3315) 3320) 3325) 3330) 3335) 3340) 3345) 3350) 3355) 3360) 3365) 3370) 3375) 3380) 3385) 3390) 3395) 3400) 3405) 3410) 3415) 3420) 3425) 3430) 3435) 3440) 3445) 3450) 3455) 3460) 3465) 3470) 3475) 3480) 3485) 3490) 3495) 3500) 3505) 3510) 3515) 3520) 3525) 3530) 3535) 3540) 3545) 3550) 3555) 3560) 3565) 3570) 3575) 3580) 3585) 3590) 3595) 3600) 3605) 3610) 3615) 3620) 3625) 3630) 3635) 3640) 3645) 3650) 3655) 3660) 3665) 3670) 3675) 3680) 3685) 3690) 3695) 3700) 3705) 3710) 3715) 3720) 3725) 3730) 3735) 3740) 3745) 3750) 3755) 3760) 3765) 3770) 3775) 3780) 3785) 3790) 3795) 3800) 3805) 3810) 3815) 3820) 3825) 3830) 3835) 3840) 3845) 3850) 3855) 3860) 3865) 3870) 3875) 3880) 3885) 3890) 3895) 3900) 3905) 3910) 3915) 3920) 3925) 3930) 3935) 3940) 3945) 3950) 3955) 3960) 3965) 3970) 3975) 3980) 3985) 3990) 3995) 4000) 4005) 4010) 4015) 4020) 4025) 4030) 4035) 4040) 4045) 4050) 4055) 4060) 4065) 4070) 4075) 4080) 4085) 4090) 4095) 4100) 4105) 4110) 4115) 4120) 4125) 4130) 4135) 4140) 4145) 4150) 4155) 4160) 4165) 4170) 4175) 4180) 4185) 4190) 4195) 4200) 4205) 4210) 4215) 4220) 4225) 4230) 4235) 4240) 4245) 4250) 4255) 4260) 4265) 4270) 4275) 4280) 4285) 4290) 4295) 4300) 4305) 4310) 4315) 4320) 4325) 4330) 4335) 4340) 4345) 4350) 4355) 4360) 4365) 4370) 4375) 4380) 4385) 4390) 4395) 4400) 4405) 4410) 4415) 4420) 4425) 4430) 4435) 4440) 4445) 4450) 4455) 4460) 4465) 4470) 4475) 4480) 4485) 4490) 4495) 4500) 4505) 4510) 4515) 4520) 4525) 4530) 4535) 4540) 4545) 4550) 4555) 4560) 4565) 4570) 4575) 4580) 4585) 4590) 4595) 4600) 4605) 4610) 4615) 4620) 4625) 4630) 4635) 4640) 4645) 4650) 4655) 4660) 4665) 4670) 4675) 4680) 4685) 4690) 4695) 4700) 4705) 4710) 4715) 4720) 4725) 4730) 4735) 4740) 4745) 4750) 4755) 4760) 4765) 4770) 4775) 4780) 4785) 4790) 4795) 4800) 4805) 4810) 4815) 4820) 4825) 4830) 4835) 4840) 4845) 4850) 4855) 4860) 4865) 4870) 4875) 4880) 4885) 4890) 4895) 4900) 4905) 4910) 4915) 4920) 4925) 4930) 4935) 4940) 4945) 4950) 4955) 4960) 4965) 4970) 4975) 4980) 4985) 4990) 4995) 5000) 5005) 5010) 5015) 5020) 5025) 5030) 5035) 5040) 5045) 5050) 5055) 5060) 5065) 5070) 5075) 5080) 5085) 5090) 5095) 5100) 5105) 5110) 5115) 5120) 5125) 5130) 5135) 5140) 5145) 5150) 5155) 5160) 5165) 5170) 5175) 5180) 5185) 5190) 5195) 5200) 5205) 5210) 5215) 5220) 5225) 5230) 5235) 5240) 5245) 5250) 5255) 5260) 5265) 5270) 5275) 5280) 5285) 5290) 5295) 5300) 5305) 5310) 5315) 5320) 5325) 5330) 5335) 5340) 5345) 5350) 5355) 5360) 5365) 5370) 5375) 5380) 5385) 5390) 5395) 5400) 5405) 5410) 5415) 5420) 5425) 5430) 5435) 5440) 5445) 5450) 5455) 5460) 5465) 5470) 5475) 5480) 5485) 5490) 5495) 5500) 5505) 5510) 5515) 5520) 5525) 5530) 5535) 5540) 5545) 5550) 5555) 5560) 5565) 5570) 5575) 5580) 5585) 5590) 5595) 5600) 5605) 5610) 5615) 5620) 5625) 5630) 5635) 5640) 5645) 5650) 5655) 5660) 5665) 5670) 5675) 5680) 5685) 5690) 5695) 5700) 5705) 5710) 5715) 5720) 5725) 5730) 5735) 5740) 5745) 5750) 5755) 5760) 5765) 5770) 5775) 5780) 5785) 5790) 5795) 5800) 5805) 5810) 5815) 5820) 5825) 5830) 5835) 5840) 5845) 5850) 5855) 5860) 5865) 5870) 5875) 5880) 5885) 5890) 5895) 5900) 5905) 5910) 5915) 5920) 5925) 5930) 5935) 5940) 5945) 5950) 5955) 5960) 5965) 5970) 5975) 5980) 5985) 5990) 5995) 6000) 6005) 6010) 6015) 6020) 6025) 6030) 6035) 6040) 6045) 6050) 6055) 6060) 6065) 6070) 6075) 6080) 6085) 6090) 6095) 6100) 6105) 6110) 6115) 6120) 6125) 6130) 6135) 6140) 6145) 6150) 6155) 6160) 6165) 6170) 6175) 6180) 6185) 6190) 6195) 6200) 6205) 6210) 6215) 6220) 6225) 6230) 6235) 6240) 6245) 6250) 6255) 6260) 6265) 6270) 6275) 6280) 6285) 6290) 6295) 6300) 6305) 6310) 6315) 6320) 6325) 6330) 6335) 6340) 6345) 6350) 6355) 6360) 6365) 6370) 6375) 6380) 6385) 6390) 6395) 6400) 6405) 6410) 6415) 6420) 6425) 6430) 6435) 6440) 6445) 6450) 6455) 6460) 6465) 6470) 6475) 6480) 6485) 6490) 6495) 6500) 6505) 6510) 6515) 6520) 6525) 6530) 6535) 6540) 6545) 6550) 6555) 6560) 6565) 6570) 6575) 6580) 6585) 6590) 6595) 6600) 6605) 6610) 6615) 6620) 6625) 6630) 6635) 6640) 6645) 6650) 6655) 6660) 6665) 6670) 6675) 6680) 6685) 6690) 6695) 6700) 6705) 6710) 6715) 6720) 6725) 6730) 6735) 6740) 6745) 6750) 6755) 6760) 6765) 6770) 6775) 6780) 6785) 6790) 6795) 6800) 6805) 6810) 6815) 6820) 6825) 6830) 6835) 6840) 6845) 6850) 6855) 6860) 6865) 6870) 6875) 6880) 6885) 6890) 6895) 6900) 6905) 6910) 6915) 6920) 6925) 6930) 6935) 6940) 6945) 6950) 6955) 6960) 6965) 6970) 6975) 6980) 6985) 6990) 6995) 7000) 7005) 7010) 7015) 7020) 7025) 7030) 7035) 7040) 7045) 7050) 7055) 7060) 7065) 7070) 7075) 7080) 7085) 7090) 7095) 7100) 7105) 7110) 7115) 7120) 7125) 7130) 7135) 7140) 7145) 7150) 7155) 7160) 7165) 7170) 7175) 7180) 7185) 7190) 7195) 7200) 7205) 7210) 7215) 7220) 7225) 7230) 7235) 7240) 7245) 7250) 7255) 7260) 7265) 7270) 7275) 7280) 7285) 7290) 7295) 7300) 7305) 7310) 7315) 7320) 7325) 7330) 7335) 7340) 7345) 7350) 7355) 7360) 7365) 7370) 7375) 7380) 7385) 7390) 7395) 7400) 7405) 7410) 7415) 7420) 7425) 7430) 7435) 7440) 7445) 7450) 7455) 7460) 7465) 7470) 7475) 7480) 7485) 7490) 7495) 7500) 7505) 7510) 7515) 7520) 7525) 7530) 7535) 7540) 7545) 7550) 7555) 7560) 7565) 7570) 7575) 7580) 7585) 7590) 7595) 7600) 7605) 7610) 7615) 7620) 7625) 7630) 7635) 7640) 7645) 7650) 7655) 7660) 7665) 7670) 7675) 7680) 7685) 7690) 7695) 7700) 7705) 7710) 7715) 7720) 7725) 7730) 7735) 7740) 7745) 7750) 7755) 7760) 7765) 7770) 7775) 7780) 7785) 7790) 7795) 7800) 7805) 7810) 7815) 7820) 7825) 7830) 7835) 7840) 7845) 7850) 7855) 7860) 7865) 7870) 7875) 7880) 7885) 7890) 7895) 7900) 7905) 7910) 7915) 7920) 7925) 7930) 7935) 7940) 7945) 7950) 7

塩として選択することができる。

また、例えば、前記(1)の場合におけるグルコースの能動輸送活性を、前記(1)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害(または抑制)する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

また、本発明のタンパク質SGLT1ホモログ遺伝子のプロモータ下流に分泌型アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼなどの遺伝子を挿入し、前記の各種細胞に発現させ、該細胞に前記試験化合物を接触させた場合における酵素活性を賦活化または阻害する化合物またはその塩を探索することによって本発明のタンパク質(SGLT1ホモログ)の発現を促進または抑制(すなわち、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害)する化合物またはその塩をスクリーニングすることができる。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたは本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドを產生する能力を有する細胞を含有するものである。

16 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、前記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物粗練抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩、本発明のタンパク質の活性(例、グルコースの能動輸送活性など)を促進または阻害する化合物またはその塩である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いらざれる。

本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩は、例えば、ヒトに対して糖尿病に対する治療・予防剤などの医薬として有用である。

また、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩は、例えば、高脂血症に対する治療・予防剤などの医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段につつて製剤化することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカ

プセル剤、無菌性溶液、懸濁液などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)に対して経口的に投与する

6 ことができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、糖尿病治療の目的で本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩を経口投与の場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物またはその塩を約0.1～100mg、

10 好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによって異なるが、例えば、糖尿病治療の目的で本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人(体重60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.1～30mg程度、

15 好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

(3) 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の定量

本発明のタンパク質に対する抗体(以下、本発明の抗体と略記する場合がある)

) 20 は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができる。被検液中の本発明のタンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができます。

すなわち、本発明は、

(1) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質との競合的

25 に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、および

(ii) 被検液と粗体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時に反応させたのち、不溶化粗体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中のタンパク質の定量法を提供する。

前記(i)の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体(以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある)を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')₂、F(ab')、あるいはFab'画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量(例えば、タンパク質)に対応した抗体、抗原もしくは抗体ー抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、^{[125]I}、^{[131]I}、^[3H]、^{[14]C}などが用いられる。前記酵素としては、例えば、β-グルコシダーゼ、アルカリフェオヌファターゼ、バーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酶などが用いられる。螢光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンシオシアネットなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミニール、ルミノール誘導体、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチンアビシン系を用いることもできる。

サンドイッチ法においては不溶化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ(1次反応)、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ(2次反応)たのち、不溶化抗体上の標識剤の活性を測定することにより検査された。本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間もすらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前述のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法においては標識用抗体あるいは固相用抗体あるいは固相用抗体あるいは固相用抗体に用いられる。

抗体は必ずしも1種類である必要なく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被測定液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被測定液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をシリエレンジリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被測定液中の抗原と固相化抗原を一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被測定液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定

し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネクロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定置方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段については、総説、成書などを参照することができる。
 例は、八江 真輔「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、八江 真輔「競ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版) (医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版) (医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができます。
 以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質の濃度を定量することによつて、(1) 本発明のタンパク質の濃度の減少が検出された場合、例えば、糖尿病などの疾患である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質を精製する

ために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

(4) 遺伝子診断剤

- 6 本発明のDNAまたは一塩基多型(SNPs)体は、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。
- 10 本発明のDNAを用いる前記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(Genomics), 第5巻, 874~879頁(1989年)、プローシーシングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーズエスエー(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 第86巻, 2766~2770頁(1989年)などにより実施することができる。
 例えは、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現低下が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、糖尿病などの疾患有ある可能性が高いと診断することができる。
- 15 特に近年、疾患関連遺伝子を探索する上で非常に重要なツールとしてSNPs(single nucleotide polymorphisms、一塩基多型)体と呼ばれる多型マークが登場し、疾患のなり易さ(なり難さ)を規定し、薬剤に対する応答性の違い・副作用の違いにも影響するものとして注目を集めている。SNPsのタイプング法としては、その具体的な目的に応じて、直接塩基配列決定法、Invader法、Slipper法、MALDI-TOF/MS法、オリゴSNPチップ法などが挙げられる(実験医学18巻1号、2000年)。
- 20 こうした手法により見出された本発明のタンパク質をコードするDNA(プロモーター領域、エキソン、イントロンを含む)に存在するSNPsは、それ自体単独

で、あるいは他の遺伝子上のSNPsや本発明のDNAと併せて解析することにより、糖尿病、高脂血症に対する罹りやすさの判定や発症時期の予測、あるいは糖尿病、高脂血症の診断に有用である。

(5) アンチセンススクレオチドを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの表現を抑制することができる本発明のアンチセンススクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または本発明のDNAの機能（例、Na⁺/IONチャンネル活性、グルコースの能動輸送活性）を抑制することができるので、例えば、高脂血症などの治療・予防剤として使用することができます。

) 10 前記アンチセンススクレオチドを前記の治療・予防剤として使用する場合、公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。
 例えば、該アンチセンススクレオチドを用いる場合、該アンチセンススクレオチドを単独あるいはトレロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアシンセーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに導入した後、常委会手段に従って、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イス、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンススクレオチドは、そのまで、あるいは授取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに劇剤化し、遮仔子錠やハイドロゲルカーテルのようなカテーテルによって投与できる。

) 15 20 該アンチセンススクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、高脂血症の治療の目的で本発明のアンチセンススクレオチドを肝臓に局所投与する場合、一般的に成人（体重60kg）においては、一日につき該アンチセンススクレオチドを約0.1～1.00mg投与する。さらに、該アンチセンススクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるために診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

(6) DNA導入動物

本発明は、外見性の本発明のタンパク質等をコードするDNA（以下、本発明の外見性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外見性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

- すなわち、本発明は、
- (1) 本発明の外見性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
 - (2) 非ヒト哺乳動物がゲッゲン動物である第(1)記載の動物、
 - (3) ゲッゲン動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および
 - (4) 本発明の外見性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。
- 本発明の外見性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA導入動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚芽発生の段階（さらには胚芽細胞または受精卵細胞の段階）でかつ一般に8細胞期以前に、リン酸カルシウム法、電気バルス法、リボフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーテイクルガン法、DEAE-テキストラン法などにより目的とするDNAを導入することによって作成することができる。また、15 16 DNA導入方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外見性DNAを導入し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA導入動物を作出することもできる。
- 非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イス、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッゲン動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F1系統、BDF1系統、B6D2F1系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar, SDなど）などが好ましい。
- 哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、前述の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどが挙げられる。
- 本発明の外見性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から單離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に導入させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを導入させる場合、これと相同意が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させようる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウスマ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA導入哺乳動物を作出することができる。

本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由來のプラスミド、枯草菌由來のプラスミド、酵母由來のプラスミド、ヒファーニなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスマまたはカリウスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由來のプラスミド、枯草菌由來のプラスミドまたは酵母由來のプラスミドなどが好ましく用いられる。

前記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳頭ウイルス、ボリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由來のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキシンII、エラスター、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチニンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランسفエラーゼ、血小板由來

成長因子 β 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ β Iサブユニット、シストロフィン、酒石酸抵抗性アリカリオフスファターゼ、心房ナトリウム利尿因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にT1e2と略される）、ナトリウムカリウムアドノシン3リン酸化酵素（Na、K-ATPase）、ニユーロフィライメント軸鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロテオニアーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーバミン β -水酸化酵素甲狀腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ボリペプチド鎖延長因子1 α （EF-1 α ）、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリノン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血漿アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロボニンC、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリンA、パソブレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトボリペプチド鎖延長因子1 α （EF-1 α ）のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。

前記ベクターは、DNA導入哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由來の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

その他、目的とする外來性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、各種哺乳動物（例えば、ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由來の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、輸卵管細胞由來DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由來RNAにより公知の方法により翻製された相補DNAを原料として取得

することができる。また、外來性の異常DNAは、前記の細胞または組織より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変異説法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は導入動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結される通常のDNA工学的手法により作製することができる。

) 6 受精卵細胞段階における本発明の外來性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するよう確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外來性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてで本発明の外來性DNAを保持することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてで本発明の外來性DNAを有する。

) 10 本発明の外來性正常DNAを導入させた非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で維代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外來性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するることは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てで本発明の外來性DNAを有することを意味する。本発明の外來性DNAを有する動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てで本発明の異常DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに特つてモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するよう繁殖することができる。

) 15 本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内生性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害 (dominant negative作用) を解明するモデルとなる。

) 20 また、本発明の外來性DNAを導入させた非ヒト哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の增加症状を有することから、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

これらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外來性正常DNAを導入させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

) 5 一方、本発明の外來性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で維代飼育することが出来る。さらに、目的とする外來DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターなどのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができます。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するよう確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てで本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てで本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に特つてモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するよう繁殖することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内生性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

) 10 また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明の正常DNAの機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害 (dominant negative作用) を解明するモデルとなる。

) 15 また、本発明の外來性DNAを導入させた非ヒト哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の增加症状を有することから、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、前記2種類の本発明のDNA導入動物のその他の利用可能性として、例えば、

- ①組織培養のための細胞源としての使用、
 - ②本発明のDNA導入動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたタンパク質組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するタンパク質との関連性についての解析、
 - ③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
 - ④前記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
 - ⑤本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。
- さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療することができます。
- また、本発明のDNA導入動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA導入細胞の取得、その後またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特化化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができる、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。
- さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な診断・治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA導入動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

(7) ノックアウト動物

- 本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。
- すなわち、本発明は、
- 5 ①本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
 - 6 ②該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第（1）項記載の胚幹細胞、
 - 7 ③ネオマイシン耐性である第（1）項記載の胚幹細胞、
 - 8 ④非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（1）項記載の胚幹細胞、
 - 9 ⑤ゲッ歯動物がマウスである第（4）項記載の胚幹細胞、
 - 10 ⑥本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
 - 11 ⑦該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するブロモーターの制御下で発現しうる第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
 - 12 ⑧非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
 - 13 ⑨ゲッ歯動物がマウスである第（8）項記載の非ヒト哺乳動物、および
 - 14 ⑩第（7）項記載の動物に、試験化合物を投与し、レボーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。
- 20 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人为的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することができる）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。
- 25 非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。
- 本発明のDNAに人为的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り

体をはずしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいは1 a c Z（ β -ガラクトトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスクエラーゼ遺伝子）を代表とするレボーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなどを挿入し、完全なメセンジャーRNAを合成できなくなることによって、結果的に遺伝子を破壊するよう構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活性化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを使いてもよく、また公知 Evans とKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝学的に明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF1マウス（C57BL/6とDBA/2とのF1）を用いて樹立したものなども良好に用いられる。BDF1マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は荷瘤モデルマ

ウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3、5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多數の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいかが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、頗る雌性培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その一例として挙げることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をすることができるので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バーンディング法による染色体の確認等により行なうことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が2n=40である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く細代培養することが必要である。例えば、STO細胞等の細胞のような適当なファイダーカélle (1-1000 U/ml) 存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37°Cで培養するなどの方法で培養し、細代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001-0.5%トリプシン/0.1-5 mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1 mM EDTA）処理により单細胞化し、新たに用意したファイダーカélle上に播種する方法などがある。このような細代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが

望まれる。

E S細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頸筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることができ(W. J. Evans及び H. Kaufman, ネイチャー(Nature) 第299巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシードイングス・オブ・ナショナル・カカディミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschmanら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年)、本発明のE S細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

16 该非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAに入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤腔に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作

出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人为的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

- 該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このよ
うなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織
が人为的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、
5 コートカラーラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られ
た個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタン
パク質のヘテロ発現不全個体同士を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質
のホモ発現不全個体を得ることができる。
10 卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内マイクロインジェクション法で
DNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入し
たトランジエンツク非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランジエンツ
ク非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異の
あるものを選択することにより得られる。
15 このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得
られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育
環境で飼育継代を行なうことができる。
ささらに、生殖系列の取得および保育についても常法に従えばよい。すなわち、該
不活性DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活性DNAを相同
20 染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動
物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような状態で飼
育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配
することにより、該不活性DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート
動物を繁殖継代する。
25 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発
現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。
また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘
導され得る種々の生物活性を失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活
性化を原因とする疾患のモデルとなり得るので、これらの疾患の原因究明及び治療

- 法の検討に有用である。
- (7 a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾患に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法
- 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病（例、動脈硬化症、高脂血症、肥満症、糖尿病など）に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。
- すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。
- 該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが擧げられる。
- 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であつてもよい。
- 具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。
- 試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。
- 例えば、動脈硬化症に対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に糖負担処置を行ない、糖負担処置前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の血糖値および体重変化などを経時的に測定する。
- 該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の血糖値が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%
- 以上低下した場合、該試験化合物を動脈硬化症に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。
- 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物は、前記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の欠損や損傷などによって引き起きたされる疾患（例、糖尿病、高脂血症など）に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができるので、前記スクリーニングで得られた化合物から誇導される化合物も同様に用いることができる。
- 該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属）などとの塩が用いられ、とりわけ生理性的に許容される酸性加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸などの塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、辛酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リノゴ酸、草酸、安息香酸、メンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。
- 該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えは、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。
- 該化合物またはその塩を含有する医薬は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、糖尿病の治療目的で該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重6.0kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～1.0mg、好ましくは約1.0～5.0mg、より好ましくは約1.0～2.0mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによつても異なるが、例えば、糖尿病の治療目的で該化合物を注射剤の形で通常成人（6.0kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～3.0mg程度、好ましくは約0.1～2.0mg程度、より好ましくは約0.1～1.0mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、6.0kg

当たりに換算した量を投与することができる。

[7 b] 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

前記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるもののが用いられる。試験化合物としては、前記と同様のものが挙げられる。遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターとしては、例えば、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53または配列番号：54で表される塩基配列を含有するプロモーターなどが用いられる。レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lac Z）、可溶性アルカリフオヌファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースするにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lac Z）で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現で、本発明のタンパク質の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従て、例えば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトビラノシド（X-gal）のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはそ

の組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液（PBS）で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37°C付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、星色を観察すればよい。また、常法に従い、lac ZをコードするmRNAを検出しててもよい。

前記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、前記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を有または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例、酢酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、マルチ酸、マレイイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リゴ酸、草酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を促進し、該タンパク質の機能を促進することができる。で、例えば、糖尿病などの疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を阻害し、該タンパク質の機能を阻害することができる。で、例えば、高脂血症などの疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を阻害する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。

本発明のタンパク質で得られた化合物またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる医薬は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えは、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、糖尿病の治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～5.0mg、より好ましくは約1.0～2.0mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、糖尿病の治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～3.0mg程度、好ましくは約0.1～2.0mg程度、より好ましくは約0.1～1.0mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのタンパクを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに前記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での生産能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。また該プロモーター部分を解析することにより新たなシスエレメントやそれに結合する転写因子を見つけることも可能である。

本明細書および図面において、基基やアミノ酸などを略号で表示する場合、I.U.PAC-I.U.B Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に觸し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければ左体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

		c DNA	：相補的デオキシリボ核酸
		A	：アデニン
		T	：チミン
		G	：グアニン
		C	：シトシン
		RNA	：リボ核酸
		m RNA	：メッセンジャーリボ核酸
		d ATP	：デオキシアデノシン三リン酸
		d TTP	：デオキシチミシン三リン酸
		d GTP	：デオキシグアノシン三リン酸
		d CTP	：デオキシシチシン三リン酸
		ATP	：アデノシン三リン酸
		EDTA	：エチレンジアミン四酢酸
		SDS	：ドデシル硫酸ナトリウム
		G ly	：グリシン
		A la	：アラニン
		V al	：バリン
		L e u	：ロイシン
		I le	：イソロイシン
		S er	：セリン
		T hr	：スレオニン
		C ys	：システイン
		M et	：メチオニン
		G lu	：グルタミン酸
		A sp	：アスパラギン酸
		L ys	：リジン
		A rg	：アルギニン
		H is	：ヒスチジン
		Phe	：フェニルアラニン

62

Tyr	:チロシン	HONB	:1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシミド
Trp	:トリプトファン	DCC	:N, N' -ジシクロヘキシカルボキシミド
本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。			
Asn	:アスパラギン	[配列番号：1]	
Gln	:グルタミン	6	ヒトSGLTホモログタンパク質のアミノ酸配列を示す。
PGlu	:ピログルタミン酸	[配列番号：2]	配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するヒトSGLTホモログタンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。
また、本明細書中で繰用される置換基、保護基および試薬を下記の配号で表記する。			
Me	:メチル基	[配列番号：3]	配列番号：3
Et	:エチル基	10	実施例1で用いられたプライマー1の塩基配列を示す。
Bu	:ブチル基	[配列番号：4]	配列番号：4
Ph	:フェニル基	11	実施例1で用いられたプライマー2の塩基配列を示す。
TC	:チアソリジン-4 (R) -カルボキサミド基	[配列番号：5]	配列番号：5
Tos	:p-トルエンスルfonyl	12	実施例1で用いられたプライマー3の塩基配列を示す。
CHO	:ホルミル	[配列番号：6]	配列番号：6
BzI	:ベンジル	13	実施例1で用いられたプライマー4の塩基配列を示す。
C1-BzI	:2, 6-ジクロロベンジル	[配列番号：7]	配列番号：7
Bom	:ベンジルオキシメチル	14	3' 非翻訳領域(2026-3140)を含むヒトSGLTホモログタンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。
Z	:ベンジルオキシカルボニル	[配列番号：8]	配列番号：8
C1-Z	:2-クロロベンジルオキシカルボニル	15	実施例2で用いられたプライマー5の塩基配列を示す。
Bz-Z	:2-ブロモベンジルオキシカルボニル	[配列番号：9]	配列番号：9
Boc	:t-ブトキシカルボニル	16	実施例2で用いられたプライマー6の塩基配列を示す。
DNP	:ジニトロフェニル	[配列番号：10]	配列番号：10
Trt	:トリチル	17	実施例3で用いられたプライマー7の塩基配列を示す。
Bum	:t-ブトキシメチル	[配列番号：11]	配列番号：11
Fmoc	:N-9-フルオレニルメトキシカルボニル	18	実施例3で用いられたプライマー8の塩基配列を示す。
HOBt	:1-ヒドロキシベンズトリゾール	[配列番号：12]	配列番号：12
HOOBt	:3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン		実施例3で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕

実施例3で用いられたプライマー-9の塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

実施例3で用いられたプライマー-10の塩基配列を示す。

〔配列番号：15〕

マウスSGLTホモログタンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：16〕

配列番号：15で表されるアミノ酸配列を有するマウスSGLTホモログタンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕

実施例6で用いられたプライマー-11の塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕

実施例6で用いられたプライマー-12の塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

実施例6で用いられたプライマー-13の塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

実施例6で用いられたプライマー-14の塩基配列を示す。

〔配列番号：21〕

実施例7で用いられたプライマー-15の塩基配列を示す。

〔配列番号：22〕

実施例7で用いられたプライマー-16の塩基配列を示す。

〔配列番号：23〕

実施例7で用いられたプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：24〕

実施例7で用いられたプライマー-17の塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

実施例7で用いられたプライマー-18の塩基配列を示す。

〔配列番号：26〕

ラットSGLTホモログタンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：27〕

配列番号：26で表されるアミノ酸配列を有するラットSGLTホモログタンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕

実施例10で用いられたプライマー-19の塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

実施例10で用いられたプライマー-20の塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

実施例10で用いられたプライマー-21の塩基配列を示す。

〔配列番号：31〕

実施例10で用いられたプライマー-22の塩基配列を示す。

〔配列番号：32〕

実施例11で用いられたプライマー-23の塩基配列を示す。

〔配列番号：33〕

実施例11で用いられたプライマー-24の塩基配列を示す。

〔配列番号：34〕

実施例11で用いられたプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：35〕

実施例11で用いられたプライマー-25の塩基配列を示す。

〔配列番号：36〕

実施例11で用いられたプライマー-26の塩基配列を示す。

〔配列番号：37〕

実施例14で用いられた免疫原ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：38〕

実施例17で用いられたC1変異導入用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：39〕

実施例17で用いられたC2変異導入用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：40〕

実施例17で得られたC1の塩基置換の入ったDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：4 1〕

実施例 1 7 で得られた C 1 の塩基置換の入ったペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：4 2〕

実施例 1 7 で得られた C 2 の塩基置換の入ったDNAの塩基配列を示す。

6 〔配列番号：4 3〕

実施例 1 7 で得られた C 2 の塩基置換の入ったペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：4 4〕

実施例 1 7 で用いられた C 3 変異導入用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：4 5〕

実施例 1 7 で得られた C 3 の塩基置換の入ったDNAの塩基配列を示す。

10 〔配列番号：4 6〕

実施例 1 7 で得られた C 3 の塩基置換の入ったペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：4 7〕

実施例 2 0 で用いられたプライマー 2 7 の塩基配列を示す。

15 〔配列番号：4 8〕

実施例 2 0 で用いられたプライマー 2 8 の塩基配列を示す。

〔配列番号：4 9〕

実施例 2 0 で用いられたプライマー K1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：5 0〕

実施例 2 0 で用いられたプライマー XI の塩基配列を示す。

20 〔配列番号：5 1〕

実施例 2 0 で得られたヒト SCL7A6 ソログ遺伝子翻訳開始点の 2261 bp 上流から 80 bp 上流領域のDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：5 2〕

実施例 2 1 で用いられた P 1 変異導入用プライマーの塩基配列を示す。

25 〔配列番号：5 3〕

実施例 2 1 で用いられた P 2 変異導入用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：5 4〕

実施例 2 1 で得られた P 2 の塩基置換の入ったDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：5 5〕

実施例 2 1 で得られた P 1 の塩基置換の入ったDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：5 6〕

実施例 2 1 で得られた P 1 および P 2 の両方の塩基置換の入ったDNAの塩基配列を示す。

5 〔配列番号：5 7〕

実施例 2 2 で用いられたプライマー K2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：5 8〕

実施例 2 2 で用いられたプライマー K3 の塩基配列を示す。

10 〔配列番号：5 9〕

実施例 2 2 で用いられたプライマー X2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：6 0〕

実施例 2 2 で用いられたプライマー X2 の塩基配列を示す。

15 〔配列番号：6 1〕

実施例 2 4 で用いられたプライマー 2 9 の塩基配列を示す。

〔配列番号：6 2〕

実施例 2 4 で用いられたプライマー K3 の塩基配列を示す。

20 〔配列番号：6 3〕

実施例 2 4 で用いられたプライマー 3 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：6 4〕

実施例 2 4 で用いられたプライマー 3 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：6 5〕

実施例 2 4 で用いられたプライマー 3 3 の塩基配列を示す。

25 〔配列番号：6 6〕

実施例 2 4 で用いられたプライマー 3 4 の塩基配列を示す。

〔配列番号：6 7〕

実施例 2 4 で用いられたプライマー 3 5 の塩基配列を示す。

〔配列番号：6 8〕

実施例 2 4 で用いられたプライマー 3 6 の塩基配列を示す。

〔配列番号：6 9〕

実施例 2 4 で用いられたプライマー 3 7 の塩基配列を示す。

(配列番号：6-9)

実施例2 4で用いられたプライマー3-8の塩基配列を示す。

(配列番号：7-0)

実施例2 4で用いられたプライマー3-9の塩基配列を示す。

(配列番号：7-1)

実施例2 4で用いられたプライマー4-0の塩基配列を示す。

(配列番号：7-2)

実施例1で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5

α/pTB213は、2 0 0 0 年(平成12年) 12月22日から日本国茨城県つくば市

東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号3 0 5 - 8 5 6 6)の独立行政法人産業

技術総合研究所 特許生物寄託センター(旧 通商産業省工業技術院生命工学

工業技術研究所：N I B H)に受託番号F E R M B P - 7 4 1 0として、2 0

0 0 年(平成12年) 12月14日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-

8 5(郵便番号5 3 2 - 8 6 8 6)の財團法人・発酵研究所(I F O)に受託番

号I F O 1 6 5 1 6として寄託されている。

(配列番号：7-3)

実施例2で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5

α/TKO-1は、2 0 0 1 年(平成13年) 6月14日から日本国茨城県つくば市

1丁目1番地1 中央第6(郵便番号3 0 5 - 8 5 6 6)の独立行政法人産業

技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号F E R M B P - 7 6 2 9とし

て、2 0 0 1 年(平成13年) 6月5日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-1

7-8 5(郵便番号5 3 2 - 8 6 8 6)の財團法人・発酵研究所(I F O)に受

託番号I F O 1 6 6 4 8として寄託されている。

(配列番号：7-4)

実施例6で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5

α/pTB238は、2 0 0 1 年(平成13年) 10月15日から茨城県つくば市東1

丁目1番地1 中央第6(郵便番号3 0 5 - 8 5 6 6)の独立行政法人産業技術

総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号F E R M B P - 7 7 7 6として、

2 0 0 1 年(平成13年) 9月27日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17

-8 5(郵便番号5 3 2 - 8 6 8 6)の財團法人・発酵研究所(I F O)に受

託番号I F O 1 6 7 0 8として寄託されている。

(配列番号：7-5)

実施例1 0で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5

α/pTB254は、2 0 0 1 年(平成13年) 12月6日から茨城県つくば市

東1-Blue/pTB254として寄託されている。

- α/pTB2239は、2 0 0 1 年(平成13年) 10月15日から茨城県つくば市東1
丁目1番地1 中央第6(郵便番号3 0 5 - 8 5 6 6)の独立行政法人産業技術
総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号F E R M B P - 7 7 7 7として、
2 0 0 1 年(平成13年) 9月27日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17
-8 5(郵便番号5 3 2 - 8 6 8 6)の財團法人・発酵研究所(I F O)に受託
番号I F O 1 6 7 0 9として寄託されている。
- 実施例1 7で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*)
XL1-Blue/pTB251は、2 0 0 1 年(平成13年) 12月6日から茨城県つくば市
東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号3 0 5 - 8 5 6 6)の独立行政法人産業
技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号F E R M B P - 7 8 1 5と
して、2 0 0 1 年(平成13年) 11月13日から大阪府大阪市淀川区十三本町
2-17-8 5(郵便番号5 3 2 - 8 6 8 6)の財團法人・発酵研究所(I F O)
に受託番号I F O 1 6 7 2 6として寄託されている。
- 実施例1 7で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*)
XL1-Blue/pTB252は、2 0 0 1 年(平成13年) 12月6日から茨城県つくば市
東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号3 0 5 - 8 5 6 6)の独立行政法人産業
技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号F E R M B P - 7 8 1 6と
して、2 0 0 1 年(平成13年) 11月13日から大阪府大阪市淀川区十三本町
2-17-8 5(郵便番号5 3 2 - 8 6 8 6)の財團法人・発酵研究所(I F O)
に受託番号I F O 1 6 7 2 7として寄託されている。
- 実施例1 7で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5
α/pTB253は、2 0 0 1 年(平成13年) 12月6日から茨城県つくば市東1
丁目1番地1 中央第6(郵便番号3 0 5 - 8 5 6 6)の独立行政法人産業技術
総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号F E R M B P - 7 8 1 7として、
2 0 0 1 年(平成13年) 11月13日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-1
-7-8 5(郵便番号5 3 2 - 8 6 8 6)の財團法人・発酵研究所(I F O)に受
託番号I F O 1 6 7 2 8として寄託されている。
- 実施例2 0で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*)
XL1-Blue/pTB254は、2 0 0 1 年(平成13年) 12月6日から茨城県つくば市

東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7818として、2001年(平成13年)1月20日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 (郵便番号532-8686) の財團法人・发酵研究所(IFO)に受託番号IFO 16729として寄託されている。

6 実施例2 1で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (Escherichia coli)

XLI-Blue/pTB2256は、2001年(平成13年)12月6日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7819として、2001年(平成13年)1月20日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 (郵便番号532-8686) の財團法人・发酵研究所(IFO)に受託番号IFO 16730として寄託されている。

実施例2 1で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (Escherichia coli) XLI-Blue/pTB2256は、2001年(平成13年)12月6日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7820として、2001年(平成13年)1月20日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 (郵便番号532-8686) の財團法人・发酵研究所(IFO)に受託番号IFO 16731として寄託されている。

20 実施例2 1で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (Escherichia coli) DH5 α /pTB2257は、2001年(平成13年)12月19日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7832として、2001年(平成13年)1月20日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-1-7-85 (郵便番号532-8686) の財團法人・发酵研究所(IFO)に受託番号IFO 16732として寄託されている。

実施例

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限

定されるものではない。なお、大腸菌を用いた遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従つた。

実施例1 ヒト臍膜由来Na⁺/グルコーストランスポータンパク質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

- ヒト臍膜cDNA (CLONTECH社) を酵母とし、2個のプライマー、プライマー1 (配列番号: 3) およびプライマー2 (配列番号: 4) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は前述cDNA 1 μ l を酵母として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATEGENE社) 1 μ l 置、プライマー1 (配列番号: 3) およびプライマー2 (配列番号: 4) を各 0.5 μ M、dNTPs を 200 μ M、および酵素に添付のバッファーアーを 5 μ l 加え、60 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 2分のサイクルを 35 回繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C 7 分の伸長反応を行つた。さらに、該PCR反応産物を酵母とし、2個のプライマー、プライマー3 (配列番号: 5) およびプライマー4 (配列番号: 6) を用いてPCR反応を行つた。該反応における反応液の組成は前述PCR反応産物 1 μ l を酵母として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATEGENE社) 1 μ l 置、プライマー3 (配列番号: 5) およびプライマー4 (配列番号: 6) を各 0.5 μ M、dNTPs を 200 μ M、および酵素に添付のバッファーアーを 5 μ l 加え、50 $^{\circ}$ C の液温とした。PCR反応は、94 $^{\circ}$ C 1分の後、96 $^{\circ}$ C 20秒、50 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 2分のサイクルを 35 回繰り返し最後に 72 $^{\circ}$ C 7 分の伸長反応を行つた。該PCR反応産物およびプラスミドベクターpME18Sを制限酵素EcoRI, SpeIで37 $^{\circ}$ C、一夜切断処理した。1%アガロースゲル電気泳動し、2Kbp DNA 斷片 (SGLTホモロジー, 3Kbp DNA 断片 (MBI 0.8S) を切り出し、ゲルエクストラクションキット (QIAGEN社) を用いてDNAを抽出し、ライゲーションキット (宝酒造社) の処方に従い、SGLTホモロジをpME18Sへサブクローニングした。これを大腸菌DH5 α に導入し、cDNAを持つクローニングアンビシンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローニングの配列を解析した結果、新規Na⁺/グルコーストランスポータンパク質をコードするcDNA配列 (配列番号: 2)を得た。これらのアミノ酸配列 (配列番号: 1) を含有する新規 Na⁺/グルコーストランスポータンパク質をヒトSGLTホモログとした。また形質転換体を大腸

大腸菌 (Escherichia coli) DH5 α /OTB2193 と金黄色

二三回の事件が日本に上回る

実施例2 ヒト肝臓由来Na/ Li^+ グルコーストランスポータンパク質をコードするcDNAのクローニングと構造配列の決定

ClonCapture cDNA Selection Kit (CLONTECH 社) の処方に従い、ヒト肝臓 cDNA ライブライマーー (CLONTECH 社) からクローニングした。ビオチン化プローブは、ヒト cGAT ホモログ cDNA を錠型として、プライマー 5' (5' -ggctcgccggcgatgttgcg-3') (配列番号：8)、プライマー 6' (5' -aggcggcgccggatggaaac-3') (配列番号：9) を用いて PCR 反応で増幅した。SGLT ホモログ cDNA の入った大腸菌の選択は、プライマー 1, 2 を用いてコロニー-PCR で行った。得られたクローンの塩基配列を解析した結果、3' 非翻訳領域 (2026-3140) を含む SGLT ホモログタンパク質をコードする cDNA 配列 (配列番号：7)を得た。また形質転換体を大腸菌 (*Escherichia coli* DH5α) に導入し、PCR で検定した結果、SGLT ホモログタンパク質をコードする cDNA 配列 (配列番号：7)を得た。

実施例 3 Taqman PCR によるヒト SGLT ホモログの発現分布の解析
 Taqman PCR に用いるプライマーおよびプローブは、Primer Express ver. 1.0 (PE
 バイオシステムジャパン) を用いて検索し、
 プライマー 1 (5' -cccgatgcgttccacatcttc -3') (配列番号 : 10),
 プライマー 8 (5' -acaaatgactggtgtggccc -3') (配列番号 : 11),
 プローブ (5' -acatccttggccggcgtttttgg -3') (配列番号 : 12)
 の組合せを選択した。プローブのリポーター色素として、FAM (6-carboxyfluorescein) を

PCR 断片を 10⁻¹ コピー/ μ l に調製してスタンダード DNA として使
用を行った。該 PCR 反応産物を 1% アガロースゲル電気泳動し、0.7 kbp DNA 断片
を切り出し、ゲルエクストラクションキット (QIAGEN 社) を用いて DNA を抽出し
た。該 PCR 断片を 10⁻¹ コピー/ μ l に調製してスタンダード DNA として使

各組織の cDNA ソースとして、Human Multiple Tissue cDNA Panel I および II (CLONTECH Laboratories, Inc.) を使用した。プライマーハイブライマー-8 100nM, プローブ 50nM, 錠型 DNA に、Taqman Universal PCR Master Mix (PE パイオシステムズジャパン)を添付薦められた規定量加え、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE バイオシステムズジャパン)で PCR 反応および解析を行つ

結果を図2に示した。主に肺臓、肝臓でヒトSGLTホモログの発現が見られた。

実施例4 SGLT発現細胞の作成

Human SGLT1 (NCBI Accession NW_000343) および SGLT2 (NCBI Accession NM_003041) の cDNA を、Clontech MTC panel kidney cDNA library から PCR 法によって増幅し、動物細胞発現ベクター pMIE18S の EcoRI, SpeI site にクローニングすることにより pMIE18S-SGLT1 および pMIE18S-hSGLT2 を作成した。プラスミド pMIE18S , pMIE18S-SGLT1 , pMIE18S-hSGLT2 各 5 μg と動物細胞発現ベクター pRSVneo 0.5 μg を Lipofectamine PLUS 法 (GIBCOBRL) で CHO 細胞 (1 × 10⁶ cells) に共導入した。G418 (500 μg/ml)、10% FBS 添加 DMEM 培地で 2 週間培養し、薬剤耐性細胞を選択した。

G418 耐性 CHO 細胞から、RNAeasy mini キット (Qiagel) を用いて、トータル RNA を抽出した。Takdhan Gold RT-PCR キット (QBI biosystems) を用い、Taqman PCR 法で SGLT ホモログ、hSGLT1, hSGLT2 の発現量を測定し、各遺伝子を発現している CHO 細胞を選択した。

実施例5 糖取りこみ量の測定

SGLT ホモログ、hSGLT1, hSGLT2 発現 CHO 細胞 および pMIE18S 導入 CHO 細胞の α-Methyl Glucose の取り込み実験は、Am. J. Physiol. 270 : G333-G343, 1996 および J. Clin. Invest. 93 : 397-404, 1994 の方法に従った。細胞を 96well プレートに 1 × 10⁴ 細胞 / well 、100 μl 10% FBS 添加 DMEM 培地で種植し、37°C,

一夜培養した。細胞をバッファー（125 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 4 mM Glutamine, 10 mM HEPES (pH 7.2), 0.1 mg/ml BSA) 150 μl で3回洗浄後同バッファーで1時間培養し、残存するグルコースを除去した。バッファーを除去し、同バッファーおよびKClをNaClあるいはNaCl + 10 μMあるいは100 μM Phlorizin (Sigma 社)に置き換えたバッファー 90 μl を添加した。1 μM α-Methyl Glucose を各 well に 10 μl ([³H] α-Methyl Glucose (アマシャム フアルミシア ハイオテク社) 0.02 μCi を含む) 添加し1時間後、冷 PBS バッファー 200 μl で3回洗浄した。各 well に液体シンチレータ 100 μl を添加し、細胞に取り込まれた ³Hのカウントを測定した。

結果を図 3 に示した。SGLT がモログは、hsSGLT, hsSGLT2 と同様に、Na 濃度によって SGLT によって選択的に細胞内に取りこまれるグルコースアナログである α-Methyl Glucoseを取り込み、この活性は Phlorizin によって阻害されたことから、SGLT の機能を持つことが証明された。

実施例 6 マウス管脚由来 Na'/グルコーストランスクルター蛋白質をコードする cDNA のクローニングと塩基配列決定

マウス腎臓 cDNA (CLONTECH 社) を鏡型とし、2 個のプライマー、プライマー-11(配列番号 : 17) およびプライマー-12(配列番号 : 18) を用いて PCR 反応を行った。該反応における反応液の組成は上記 cDNA 1 μl を鏡型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE 社) 1 μl 量、プライマー-11(配列番号 : 17) およびプライマー-12(配列番号 : 18) を各 0.5 μM、dNTPs を 200 μM、および酵素に添付のバッファーを 5 μl 加え、50 μl の液量とした。PCR 反応は、94°C・1 分の後、96°C・20 秒、72°C・30 秒、72°C・2 分 30 秒のサイクルを 40 回繰り返し、最後に 72°C・7 分の伸長反応を行った。該反応における反応液の組成は上記 PCR 反応産物 1 μl を鏡型として使用し、Pfu Turbo DNA polymerase (STRATAGENE 社) 1 μl 量、プライマー-13(配列番号 : 19) およびプライマー-14(配列番号 : 20) を用いて PCR 反応を行った。該反応における反応液の組成は上記 PCR 反応産物 1 μl を鏡型として使用し、Pfu Turbo DNA polymerase (STRATAGENE 社) 1 μl 量、0.5 μM、dNTPs を 200 μM、および酵素に添付のバッファーを 5 μl 加え、50 μl の液量とした。PCR 反応は、94°C・1 分の後、96°C・20 秒、72°C・30 秒のサイクルを 40 回繰り返し、最後に 72°C・7 分の伸長反応を行った。該 PCR 反応産物を 2% アガロースゲル電気泳動し、0.9 kbp DNA 斷片を切り出し、ゲルエクストラクションキット (QIAGEN 社) を用いて DNA を抽出した。

繰り返し、最後に 72°C・7 分の伸長反応を行った。該 PCR 反応産物およびプラスミドベクター pME18S を制限酵素 EcoRI, Spe I で 37°C、一夜切断処理した。1% アガロースゲル電気泳動し、2 kbp DNA 断片 (マウス SGLT ホモログ)、3 kbp DNA 断片 (pME18S) を切り出し、ゲルエクストラクションキット (QIAGEN 社) を用いて DNA を抽出し、ライダーションキット (宝酒造社) の処方に従い、SGLT ホモログを pME18S ヘサブクリオーニングした。これを大腸菌 DH5 α に導入し、cDNA を持つクローンをアンピシリンを含む LB 施天培地中に選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規 Na'/グルコーストランスクルター蛋白質をコードする cDNA 配列 (配列番号 : 16) を得た。これらのアミノ酸配列 (配列番号 : 16) を含有する新規 Na'/グルコーストランスクルター蛋白質をマウス SGLT ホモログとした。また、形質転換体を大腸菌 (Escherichia coli) DH5 α/pTB2238 と命名した。

マウス SGLT ホモログの疎水性プロット図を図 4 に示す。

実施例 7 TagMan PCR によるマウス SGLT ホモログの発現分布の解析

TaqMan PCR に用いるプライマーおよびプローブは、Primer Express ver. 1.0 (PE パイオシステムズジャパン) を用いて検索し、

15 プライマー-15 (5' -tgcacagccaggatggatgg-3') (配列番号 : 21)
 プライマー-16 (5' -gtacggaggccccccttg-3') (配列番号 : 22)
 プローブ (5' -ttcgtagccaaatctttcacatg-3') (配列番号 : 23)

を選択した。プローブのリボーター色素として、FAM (6-carboxyfluorescein) を付加した。

16 スタンダード DNA としてマウス SGLT ホモログの PCR 断片を使用した。PCR 反応における反応液の組成は pTB2238 DNA 1 μl を鏡型として使用し、Pfu Turbo DNA polymerase (STRATAGENE 社) 1 μl 量、プライマー-17 (5' -atcctaatagtccatggaaatgt-3') (配列番号 : 24) およびプライマー-18 (5' -accaggttgggtttagggatggcaat-3') (配列番号 : 25) を各 0.5 μM、dNTPs を 200 μM、および酵素に添付のバッファーを 5 μl 加え、50 μl の液量とした。PCR 反応は、94°C・1 分の後、96°C・20 秒、72°C・30 秒、72°C・30 秒のサイクルを 40 回繰り返し、最後に 72°C・7 分の伸長反応を行った。該 PCR 反応産物を 2% アガロースゲル電気泳動し、0.9 kbp DNA 断片を切り出し、ゲルエクストラクションキット (QIAGEN 社) を用いて DNA を抽出した。

該PCR断片を $10^9\text{-}10^8\text{コピー}/\mu\text{l}$ に調整してスタンダードDNAとして使用した。

各組織のcDNAソースとして、6週齢のC57BL/6マウス(チャーリズリバーエ社)より肝臓、腎臓、肺臓、骨格筋、白色脂肪組織を摘出、ここからtotal RNAを抽出した。total RNAの抽出はISOCEN(ニッポンシン生)の方法に従つた。得られたRNA $0.1\mu\text{g}$ を鏡型としてTaqman Reverse Transcription Reagents(Roche社)の方法に従い、cDNAを合成した。このcDNA $1\mu\text{l}$ を鏡型とし、プライマー-16(配列番号：21) 200nM、プライマー-16(配列番号：22) 200nM、ブロープ(配列番号：23) 50nM、にTaqman universal PCR Master mix(PEバイオシステムズジャパン)を添付書類記載の規定量加え、ABI PRISM 7700 sequence Detection system(PEバイオシステムズジャパン)でPCR反応および解析を行つた。各組織のmRNA量はGAPDH値で補正した。GAPDHはTaqMan Rodent GAPDH Control Reagents VIC Probe(アプライドバイオシステムズジャパン)を使用し、上記同様に添付書類記載の規定量加え、ABI PRISM 7700 sequence Detection systemでPCR反応および解析を行つた。

結果を図5に示した。マウスSGLTホモログは腎臓で高い発現が認められた。
実施例8 マウスSGLTホモログ発現細胞の作成
Human SGLT1(NCBI Accession NM_000343)のcDNAをClontech MTC panel kidney cDNA libraryからPCR法によって増幅し、動物細胞発現ベクターpMB18SのEcoR I、Sph I siteにナシクローニングすることによりpMB18S-hSGLT1を作成した。
20 プラスミドpMB18S、pMB18S-hSGLT1、およびpMB18S-マウスSGLTホモログ各 $1\mu\text{g}$ をFUGENE6法(Roche社)でCOS7細胞(5×10^6 細胞)に導入した。
実施例9 糖取り込み量の測定
pMB18S-hSGLT1およびマウスSGLTホモログ導入COS7細胞の α -Methyl Glucoseの取り込み実験は、Am. J. Physiol. 270:G633-G643, 1996およびJ. Clin. Invest. 93:397-404, 1994の方法に従つた。細胞を96穴プレートに 3×10^4 細胞/ well 、 $100\mu\text{l}$ 10%FBS添加DMEM培地で懸垂し、37°Cで一夜培養した。細胞をバッファー(125mM KCl, 1.2mM KH₂PO₄, 2.5mM CaCl₂, 1.2mM MgSO₄, 4mM Glutamine, 10mM HEPES(pH7.2), 0.1mg/ml BSA) 150 μl で3回洗浄後、同バッファーで1時間培養し、残存するグルコースを除去した。バッファーを除去し、同バッファーおよび

KClをNaCl、あるいはNaCl+100 μM phlorizin(Sigma社)、あるいはNaCl+1mM phlorizinに置き換えたバッファー-90 μl を添加した。1mM α -Methyl Glucoseを各wellに $10\mu\text{l}$ ($[^{14}\text{C}]$ α -Methyl Glucose(アマシャムファルマシアバイオテク社) 0.02 μCi を含む)を添加し、1時間後、冷PBSバッファー-200 μl で3回洗浄した。各wellに液体シンチレータ100 μl を添加し、細胞に取り込まれた $[^{14}\text{C}]$ のカウントを測定した。
結果を図6に示した。マウスSGLTホモログは、hSGLT1と同様に、Na⁺依存性にSGLTによって選択的に細胞内に取り込まれるグルコースアナログである α -Methyl Glucoseを取り込み、この活性はphlorizinによって阻害されたことから、SGLTの機能を得つことが証明された。

実施例10 ラット腎臓由来Na⁺/グルコーストランスポーター蛋白質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列決定
ラット腎臓cDNA(CLONTECH社)を鏡型とし、2個のプライマー、プライマー-19(配列番号：28)およびプライマー-20(配列番号：29)を用いてPCR反応を行つた。該反応における反応液の組成は上記cDNA 1 μl を鏡型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATEGENE社) 1 μl 、プライマー-19(配列番号：28)およびプライマー-20(配列番号：29)を各0.5 μM 、dNTPsを200 μM 、および酵素に添付のバッファーを5 μl 加え、50 μl の被液とした。PCR反応は、94°C・1分の後、96°C・20秒、62°C・30秒、72°C・2分30秒のサイクルを40回繰り返し、最後に72°C・1分の伸長反応を行つた。さらに該PCR反応産物を鏡型とし、2個のプライマー、プライマー-21(配列番号：30)およびプライマー-22(配列番号：31)を用いてPCR反応を行つた。該反応における反応液の組成は上記PCR反応産物1 μl を鏡型として使用し、Pfu Turbo DNA polymerase (STRATEGENE社) 1 μl 、プライマー-21(配列番号：30)およびプライマー-22(配列番号：31)を各0.5 μM 、dNTPsを200 μM 、および酵素に添付のバッファーを5 μl 加え、50 μl の被液とした。PCR反応は、94°C・1分の後、96°C・20秒、62°C・30秒、72°C・2分30秒のサイクルを40回繰り返し、最後に72°C・1分の伸長反応を行つた。該PCR反応産物およびプラスミドベクターpMB18Sを制限酵素EcoR I、Spe Iで37°C、一夜切断処理した。1%アガロースゲル電気泳動し、2kbp DNA断片(ラットSGLTホモログ)、3kbp DNA断片(hME18S)を切り出し、ゲルエクスト

ラクションキット (Qiagen社) を用いてDNAを抽出し、ライゲーションキット(宝酒社)の処方に従い、SGLTホモログをpME18Sへサブクローニングした。これを大腸菌 DH5 α に導入し、cDNAを持つかローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規Na⁺/グルコーストランスポーター蛋白質をコードするcDNA配列 (配列番号 : 27)を得た。これらのアミノ酸配列 (配列番号 : 26)を含有する新規Na⁺/グルコーストランスポーター蛋白質をラットSGLTホモログとした。また、形質転換体を大腸菌 (Escherichia coli) DH5 α /pTB2239と命名した。

ラットSGLTホモログの疎水性プロット図を図7に示す。

実施例1.1 TagMan PCRによるラットSGLTホモログの発現分布の解析
TagMan PCRに用いるプライマーおよびプローブは、Primer Express ver.1.0 CE/ハイオシステムズジャパン)を用いて検索し、

プライマー23 (5' -tcacacgtttgcacccatgc-3') (配列番号 : 32)

プライマー24 (5' -ggaaacctggcccttcggg-3') (配列番号 : 33)

プローブ (5' -tgcacggaccagggtttatggc-3') (配列番号 : 34)

を選択した。プローブのリポーター色素として、FAM(6-carboxyfluorescein)を付加した。PCRの反応液の組成はpTB2239 DNA 1 μ lを錠型として使用し、Riti Turbo DNA polymerase (STRATAGENE 社) 1 μ l量、プライマー 25 (5' -tcggatgcacccatgcacccatgc-3') (配列番号 : 35) およびプライマー 26 (5' -cggcccttcgtttgcacccatgc-3') (配列番号 : 36)を各0.5 μ M, dNTPsを200 μ M、

および解離に添付のバッファーを5 μ lを加え、50 μ lの液量とした。PCR反応は、94℃・1分の後、96℃・20秒、62℃・30秒、72℃・30秒のサイクルを40回繰り返し、最後

に72℃・7分の伸長反応を行った。該PCR反応産物を2%アガロースゲル電気泳動し、0.9kb DNA断片を切り出し、ゲルエクストラクションキット (QIAGEN社) を用いてDNAを抽出した。該PCR断片を10 \times TBE/10 μ lに調整してスタンダードDNAとして使用した。

各組織のcDNAソースとして、Sprague-Dawley Rat Poly A⁺ RNA (CLONTECH社) (Brain,

Heart, Kidney, Liver, Lung, Pancreas, Retina, Skeletal Muscle, Smooth muscle, Spleen, Testis) を使用した。このRNA0.1 μ gを錠型としてTagMan Reverse Transcription Reagents (Roche社) の方法に従い、cDNAを合成した。このcDNA 1 μ lを錠型とし、プライマー23 (配列番号 : 32) 200nM、プライマー24 (配列番号 : 33) 5 200nM、プローブ (配列番号 : 34) 50nM、にTagMan universal PCR Master Mix (PEバイオシステムズジャパン)を添付種類記載の規定量加え、ABI PRISM 7700 sequence Detection system (PEバイオシステムズジャパン)でPCR反応および解析を行った。

各組織のmRNA量はGAPDH量で補正した。GAPDHはTagMan Rodent GAPDH Control Reagents VIC Probe (アプライドバイオシステムズジャパン)を使用し、上記と同様に添付種類記載の規定量加え、ABI PRISM 7700 sequence Detection systemでPCR反応および解析を行った。

結果を図8に示した。ラットSGLTホモログは腎臓と平滑筋において高い発現が認められた。

実施例1.2 ラットSGLTホモログ発現細胞の作成

Human SGLT1 (NCBI Accession No.000343)のcDNAをClontech MTC panel kidney cDNA libraryからPCR法によって増幅し、動物細胞発現ベクターpME18SのpGK1、pME18S、pME18S-hSGLT1、およびpME18S-ラットSGLTホモログ各1 μ gをDUGENE6法 (Roche社) でCOS細胞 (5 \times 10⁶細胞) に導入した。

実施例1.3 糖取り込み量の測定

pME18S、hSGLT1およびラットSGLTホモログ導入COS7細胞の α -Methyl Glucoseの取り込み実験は、Am. J. Physiol. 270:c633-c643, 1996およびJ. Clin. Invest. 93:397-404, 1994の方法に従った。細胞を96穴プレートに3 \times 10細胞/well、100 μ l N0FS添加DMEM培地で培養し、37℃で一夜培養した。細胞をバッファー (1 2 25 5 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 4 mM Glutamine, 10 mM HEPES (pH7.2), 0.1 mg/ml BSA) 150 μ lで3回洗浄後、同バッファーで1時間培養し、残存するグルコースを除去した。バッファーを除去し、同バッファーおよびKClをNaCl、あるいはNaCl+100 μ M phlorizin (Sigma社)、あるいはNaCl+1 mM phlorizinに置き換えたバッファー90 μ lを添加した。1mM α -Methyl Glucoseを各wellに10

μ l [14 C] α -Methyl Glucose (アマシャム ファルマシア、バイオテク社) 0.02 μ Ciを含む) を添加し、1時間後、冷PBSバッファー-200 μ lで3回洗浄した。各wellに液体シンチレータ100 μ lを添加し、細胞に取り込まれた 14 Cのカウントを測定した。

結果を図9に示した。ラットSGLT1ホモログは、hSGLT1と同様に、Na⁺依存性にSGLTによって選択性に細胞内に取り込まれるグルコースアナログである α -Methyl Glucoseを取り込み、この活性はphlorizinによって阻害されたことから、SGLTの機能を持つことが証明された。

実施例14 抗ヒトSGLTホモログペプチド抗体の作製

ヒトSGLTホモログの261-275の216番目のアミノ酸残基にシスティンをつけたもの(クラボウセ)を免疫原ペプチドとして使用した(配列番号: 37)。N-(アーマレイミドブチリコキシ)サクシニミド(GMBS)とKeyhole Limpet Hemocyanin(KLH)を混合し、室温で40分反応した。セファデックスG-25カラムで分画し、マレイミド基の導入されたKLHを得た。免疫原ペプチド5mgとマレイミド基の導入されたKLHを等量混合し4°Cで1日間反応した。PBS bufferで2日間透析し、PBS bufferに1mg/mlの濃度で凍結した。

完全フロイントッシュバントと抗原を等量で混合し(トータル0.6 ml)、3ヶ月齢のNew Zealand white rabbitに皮下免疫した。以後、2～3週間おきに同量の免疫原を不完全フロイントッシュバントとともに3回追加免疫した。

5mgの合成ペプチドとSulfoLink gel 5mlを、システィンを介して結合させ、PBS bufferで平衡化した。5mlの抗血清、ペプチドを結合したゲルに通し、PBS buffer (5 ml)で3回洗浄した。ペプチドに結合した抗体を0.1Nグリシン-HCl buffer (pH 2.5) 8 mlで溶出した。2.4 mlのTris bufferで中和し、抗ヒトSGLTホモログペプチド抗体とした。

実施例15 抗ヒトSGLTホモログペプチド抗体によるエスタンプロテイング

ヒトSGLTホモログ、hSGLT1、hSGLT2発現CHO細胞およびMBI18Sベクター導入CHO細胞に対し、抗ヒトSGLTホモログペプチド抗体を用いてウエスタンプロティングを行った。各細胞を5wellプレートに 1×10^6 細胞/2ml 10% FBS 添加MEM α 培地/wellで播種し、37°C、一夜培養した。細胞をバッファー(62.5 mM

Tris(pH 8), 2% SDS)に懸濁し、超音波破碎機で細胞を破碎した。5%容2-Mルカートエタノール、10%容グリセロールを加え、5分煮沸した後、氷冷した。各サンプル50 μ g相当量をとり、7.5%アクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行った。泳動したゲルをセミドライトランスターファー法でニトロセルロースメンブレン(BIOLRAD社)に転写した。転写したニトロセルロースメンブレンを5%スキムミルクを溶解したTBSTバッファー(10mM Tris(pH7.5), 150mM NaCl, 0.05%Tween20)浴液中で、4°Cで一晩反応させた。1次抗体溶液として抗ヒトSGLTホモログペプチド抗体をTBSTバッファーで50倍に希釈したものを用い、メンブレンを抗体浴液中で室温で4時間反応させた。メンブレンをTBSTバッファーで5回洗浄した後、二次抗体として抗ラビット-HRP抗体(アマシャムファルマシア社)をTBSTバッファーで10000倍希釈したものを使えた。室温で1時間反応させ、その後TBSTバッファーで5回洗浄した。ルネッサンス γ リミノールウェスタンプロット化学発光検出試薬プラス(NEN life science社)浴液中で1分反応させ、X線フィルムで現像した。

結果を図10に示した。抗ヒトSGLTホモログペプチド抗体が矢印で示したヒトSGLTホモログを特異的に認識することが証明された。

実施例16 抗ヒトSGLTホモログペプチド抗体によるヒト肺臓、肝臓切片の免疫染色

PCR解析の結果からSGLTホモログ遺伝子はヒトでは肺臓、肝臓及び腎臓に多く発現していることがわかった。そこでSGLTホモログ遺伝子の糖尿病治療開発上での標的臓器を同定し、その遺伝子機能を明らかにするため、抗ヒトSGLTホモログペリオーナル抗体(クラボウ)を用いて正常ヒト肺臓及び肝臓でのSGLTホモログ遺伝子の発現を免疫染色法によって調べた。

正常ヒト肺臓及び肝臓の組織サンプルはBiochain社から購入した、倫理上問題のないとされる市販スライドグラスを用いた。切片の一端は脱パラフィン後、定法に従ってヘマトキシリエンオジン染色を行い封入し、形態学的観察を行った(組織学研究法、佐野豊、南山堂、1985年)。さらに同じロットのほぼ連続と考えられる切片について、抗ヒトSGLTホモログペリオーナル抗体を用いて免疫染色を行った。組織のマウントされたスライドガラスを脱パラフィン後、免疫染色を行つた。

25 正常ヒト肺臓及び肝臓の組織サンプルはBiochain社から購入した、倫理上問題のないとされる市販スライドグラスを用いた。切片の一端は脱パラフィン後、定法に従ってヘマトキシリエンオジン染色を行い封入し、形態学的観察を行った(組織学研究法、佐野豊、南山堂、1985年)。さらに同じロットのほぼ連続と考えられる切片について、抗ヒトSGLTホモログペリオーナル抗体を用いて免疫染色を行つた。組織のマウントされたスライドガラスを脱パラフィン後、免疫染色を行つた。

た。免疫染色はベクターステイン ABCキット(ペルオキシダーゼ法、ベクター社)を用いて行った。発色基質にはDABを用いた。具体的な実験手順はキット添付のマニュアルに従って行った。

SGLT1ホモログ遺伝子の発現は肺臓では腺房細胞に強く見られ、肝臓では肝実質細胞全体に渡って発現が見られた。また肝実質細胞での発現に極性は見られなかつた。

実施例17 SNP を有するヒトSGLT1ホモログ発現ベクターの作製

Celera社 SNP データベースを検索するとヒトSGLT1ホモログ遺伝子には、3ヶ所 SNP が認められた(図11)。G333Aの塩基置換は、Val146Met のアミノ酸置換を起こし、これを SNP C1 と命名した。G786Tの塩基置換は、Met262Ile のアミノ酸置換を起こし、これを SNP C2 と命名した。G1755Tの塩基置換は、Glu585Stop のアミノ酸置換を起こし、これを SNP C3 と命名した。

SNP C1, C2 の塩基置換は、pME18S-ヒトSGLT1ホモログ(ptB2193) DNA に QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATEGENE社) を用いて導入した。ptB2193 10ng、反応 buffer 5μl、C1 変異導入用プライマー(配列番号：38)あるいはC2 変異導入用プライマー(配列番号：39) 125ng, dNTP mix 1 μl、QuickSolution 3μl に蒸留水を添加して 50μl とし、Pfu Turbo DNA Polymerase(2.5U/μl)を 1μl 添加した。PCR 反応は、95°C・1 分の後、95°C・50 秒、60°C・50 秒、68°C・12 分のサイクルを 18 回繰り返し、最後に 68°C・7 分の伸長反応を行った。該 PCR 反応産物に制限酵素 Dpn I(10U)を添加し、37°Cで 1 時間反応し、メチル化された親鎖 DNA を切断した。これを大腸菌 XL1-Blue に導入し、cDNA を持つクローナンを、アンビシンを含むLB寒天培地で選択した。

このクローナンの配列を解析し、C1 の塩基置換の入った cDNA 配列(配列番号：40)、アミノ酸配列(配列番号：41)を得た。また形質転換体を大腸菌(Escherichia coli) XL1-Blue /ptB2251 と命名した。次に C2 の塩基置換の入った cDNA 配列(配列番号：42)、アミノ酸配列(配列番号：43)を得た。また形質転換体を大腸菌(Escherichia coli) XL1-Blue /ptB2252 と命名した。

SNP C3 の塩基置換は、pME18S-ヒトSGLT1ホモログ(ptB2193) DNA を鮮型とし、2 個のプライマー、プライマー-3(配列番号：5) およびC3変異導入用プライマー(配列番号：44)を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記DNA 10ngを鮮型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATEGENE社) 1μl量、プライマー-3(配列番号：5) およびC3変異導入用プライマー(配列番号：44)を各 0.5 μl、dNTPsを200μM、および酵素に添付のバッファーを5μl 加え、50μlの液量とした。PCR反応は、94°C・1分の後、95°C・20秒、67°C・30秒、72°C・2分30秒のサイクルを40回繰り返し、最後に72°C・7分の伸長反応を行った。該PCR反応産物およびプラスミドベクターpME18Sを制限酵素EcoRI(10U)、SpeI(10U)で37°C、一夜切断処理した。1%アガロースゲル電気泳動し、1.8 Kbp DNA Marker (SGLT1がモログ), 3Kbp DNA Marker(pME18S)を切り出し、ゲルエクストラクションキット(Qiagen社)を用いてDNAを抽出し、ライゲーションキット(宝酒造社)の処方に従い、C3変異の導入されたSGLT1ホモログをpME18Sへ接合した。これを大腸菌DH5αに導入し、cDNAを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローナンを、アンビシンを含むLB寒天培地中で選択した。これを大腸菌(Escherichia coli)アミノ酸配列(配列番号：46)を得た。また形質転換体を大腸菌(Escherichia coli) DH5 α/pTB2253と命名した。

実施例18 SNP を有するヒトSGLT1ホモログ発現細胞の作製

動物細胞発現ベクターpME18S、pME18S-hSGLT1 および pME18S-ヒトSGLT1ホモログ(ptB2193)、pME18S-ヒトSGLT1ホモログ SNP-C1 (ptB2251)、pME18S-ヒトSGLT1ホモログ SNP-C2 (ptB2252)、pME18S-ヒトSGLT1ホモログ SNP-C3 (ptB2253) 各 1μg と FuGENE 6 (Roche社) 3μl を Opti-MEM (Gibco-BRL社) 100μl に添加し、15分間室温で放置した後、COS7細胞(1×10細胞/ml 10% FBS添加寒天培地 / 6 well plate)に添加し遺伝子導入した。

実施例19 SNP を有するヒトSGLT1ホモログ発現細胞の糖取り込み活性の測定

pME18S、pME18S-hSGLT2 および pME18S-ヒトSGLT1ホモログ(ptB2193)、pME18S-pME18S-hSGLT2 および pME18S-ヒトSGLT1ホモログ(ptB2251)、pME18S-ヒトSGLT1ホモログ SNP-C1 (ptB2251)、pME18S-ヒトSGLT1ホモログ SNP-C2 (ptB2252)、pME18S-ヒトSGLT1ホモログ SNP-C3 (ptB2253)導入COS7細胞の α -Methyl Glucoseの取り込み実験は、Am. J. Physiol. 270:G833-G843, 1996およびJ. Clin. Invest. 93:397-404, 1994の方法に従った。遺伝子導入処理した細胞は、一日培養後の穴プレートに3×10⁴細胞/well、100μl 10%FBS添加寒天培地で播種し、37°Cで一夜培

列番号：44)を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記DNA 10ngを鮮型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATEGENE社) 1μl量、プライマー-3(配列番号：5) およびC3変異導入用プライマー(配列番号：44)を各 0.5 μl、dNTPsを200μM、および酵素に添付のバッファーを5μl 加え、50μlの液量とした。PCR反応は、94°C・1分の後、95°C・20秒、67°C・30秒、72°C・2分30秒のサイクルを40回繰り返し、最後に72°C・7分の伸長反応を行った。該PCR反応産物およびプラスミドベクターpME18Sを制限酵素EcoRI(10U)、SpeI(10U)で37°C、一夜切断処理した。1%アガロースゲル電気泳動し、1.8 Kbp DNA Marker (SGLT1がモログ), 3Kbp DNA Marker(pME18S)を切り出し、ゲルエクストラクションキット(Qiagen社)を用いてDNAを抽出し、ライゲーションキット(宝酒造社)の処方に従い、C3変異の導入されたSGLT1ホモログをpME18Sへ接合した。これを大腸菌DH5αに導入し、cDNAを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローナンを、アンビシンを含むLB寒天培地中で選択した。これを大腸菌(Escherichia coli)アミノ酸配列(配列番号：46)を得た。また形質転換体を大腸菌(Escherichia coli) DH5 α/pTB2253と命名した。

実施例19 SNP を有するヒトSGLT1ホモログ発現細胞の糖取り込み活性の測定

pME18S、pME18S-hSGLT2 および pME18S-ヒトSGLT1ホモログ(ptB2193)、pME18S-pME18S-hSGLT2 および pME18S-ヒトSGLT1ホモログ(ptB2251)、pME18S-ヒトSGLT1ホモログ SNP-C1 (ptB2251)、pME18S-ヒトSGLT1ホモログ SNP-C2 (ptB2252)、pME18S-ヒトSGLT1ホモログ SNP-C3 (ptB2253)導入COS7細胞の α -Methyl Glucoseの取り込み実験は、Am. J. Physiol. 270:G833-G843, 1996およびJ. Clin. Invest. 93:397-404, 1994の方法に従った。遺伝子導入処理した細胞は、一日培養後の穴プレートに3×10⁴細胞/well、100μl 10%FBS添加寒天培地で播種し、37°Cで一夜培

接した。細胞をバッファー（125mM KCl, 1.2mM KH₂PO₄, 2.5mM CaCl₂, 1.2mM MgSO₄, 4mM Glutamine, 10mM HEPES (pH7.2), 0.1mg/ml BSA) 150μlで3回洗浄後、同バッファーで1時間培養し、残存するグルコースを除去した。バッファーを除去し、同バッファーにおいてNaClをNaCl、あるいはNaCl+100μM phlorizin (Sigma社)、あるいはNaCl+1mM phlorizinに置き換えたバッファー-90μlを添加した。1mM α-Methyl Glucoseを各wellに10μl ([¹⁴C] α-Methyl Glucose (アマシャム フアルマシアバイオテク社) 0.02μCiを含む) を添加し、1時間後、冷PBSバッファー-200μlで3回洗浄した。各wellに液体シンチレーター100μlを添加し、細胞に取り込まれたセカウントを測定した。

- 10 pME18S vector導入COS-7細胞 (KCl) の糖取り込み量を1として、結果を図12に示した。ヒトSGLTホモログは、hsSGLT2と同様に、NaClで糖取り込みが上昇し、SGLTの特異的阻害剤フロリシンによって抑制された。SNP C1は、NaClによる糖取り込み活性の上昇が低下していた。SNP C2は、糖取り込み活性に有意な差は認められなかった。SNP C3は、NaClによる糖取り込み活性の上昇が消失していた。
- 15 實施例2 0 ヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域のクローニングと塩基配列の決定ヒトゲノム遺伝子 (CLONTECH社) を鋸型とし、2個のプライマー-27 (配列番号：47) およびプライマー-28 (配列番号：48) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は前駆ゲノムDNA 1μlを鋸型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATEGENE社) 1μl量、プライマー-27 (配列番号：47) を0.5μM、プライマー-28 (配列番号：48) を0.5μM、dNTPsを200μM、および酵素に添付のバッファーを5μl加え、50μlの液量とした。PCR反応は、94°C・1分の伸長20秒、65°C・30秒、72°C・4分のサイクルを40回繰り返し、最後に72°C・7分の伸長を行った。さらに、該PCR反応産物を鋸型とし、2個のプライマー、プライマーK1 (配列番号：49) およびプライマー-X1 (配列番号：50) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は前駆PCR反応産物 1μlを鋸型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATEGENE社) 1μl量、プライマー-K1 (配列番号：49) およびプライマー-X1 (配列番号：50) を各0.5μM、dNTPsを200μM、および酵素に添付のバッファーを5μl加え、50μlの液量とした。PCR反応は、94°C・1分の後、96°C・1分の後、96°C・20秒、65°C・30秒、72°C・3分のサイクルを40回繰り返し、最後に68°C・7分の伸長を行った。該PCR反応産物に制限酵素 DpnI (10U) を添加し、37°Cで1時間反応し、メチル化された親鎖DNAを切断した。これを大腸菌 XL-1 Blue に導入し、プラスミドを持つクローニングを解析し、P2 の塩基置換の入ったDNA配列 (配列番号：54) を得た。また形質転換体を大腸菌 (Escherichia coli) XL1-Blue / pTB2255

7分の伸長反応を行った。該PCR反応産物およびホタル・ルシフェラーゼ発現プラスミドベクター-pGIV-B2 (ニッポンシンジン社) を制限酵素KpnI (10U)、XbaI (10U) で37°C、一夜切斷処理した。1% アガロースゲル電気泳動し、2.3 Kbp DNA断片 (ヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域)、4.8Kbp DNA断片 (pGIV-B2) を切り出し、ゲルエクストラクションキット (QIAGEN社) を用いてDNAを抽出し、ライケーションキット (宝酒造社) の処方に従い、ヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域をpGIV-B2へサブクローニングした。これを大腸菌DH5 αに導入し、cDNAを持つクローニングを含むLB寒天培地で選択した。個々のクローニングの配列を解析した結果、ヒトSGLTホモログ遺伝子翻訳開始点の9261bp上流から88bp上流領域のDNA配列 (配列番号：51)を得た。また形質転換体を大腸菌 (Escherichia coli) XL1-Blue / pTB2254と命名した。

10 ヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域DNA配列には、IS11, IS1156, PPAR, HNF4などの転写因子の認識結合配列、RNAポリメラーゼが結合するTATA boxが存在した (図13)。

15 實施例2 1 SNPを有するヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域の作製 Celera社 SNPデータベースを検索すると、ヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域に2ヶ所のSNPが見つかった (図13)。C翻訳開始点 1564bp 上流 T を SNP-P1、A 翻訳開始点 1438bp 上流 T を SNP-P2と命名した。

20) SNP P1, P2 の塩基置換は、pGIV-B2-ヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域 (pTB2254) において導入した。pTB2254 10ng、反応 buffer 5μl、P1 变異導入用プライマー (配列番号：52) あるいはP2 变異導入用プライマー (配列番号：53) 125ng、dNTP mix 1μl、QuickSolution 3μl に蒸留水を添加して 50μl とし、Pfu Turbo DNA Polymerase (2.5U/μl) を 1μl 添加した。PCR 反応は、95°C・1分の後、95°C・50秒、60°C・50秒、68°C・12 分のサイクルを 18 回繰り返し、最後に 68°C・7 分の伸長を行った。該PCR反応産物に制限酵素 DpnI (10U) を添加し、37°Cで1時間反応し、メチル化された親鎖DNAを切断した。これを大腸菌 XL-1 Blue に導入し、プラスミドを持つクローニングを解析した。個々のクローニングの配列を解析し、P2 の塩基置換の入ったDNA配列 (配列番号：54) を得た。また形質転換体を大腸菌 (Escherichia coli) XL1-Blue / pTB2255

と命名した。P1 の塩基置換の入った DNA 配列 (配列番号 : 55) を得た。また形質転換体を大腸菌 (*Escherichia coli*) XL1-Blue /pTB2256 と命名した。P1, P2 両方の塩基置換の入った DNA 配列 (配列番号 : 56) を得た。また形質転換体を大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5 α /pTB2257 と命名した。

実施例 2.2 ヒト SGLT ホモログ遺伝子上流領域の欠失変異体の作製

ヒト SGLT ホモログ遺伝子上流領域 (pTB2254) DNA を鏡型とし、2 個のプライマーセット、プライマー-K2 (配列番号 : 57) およびプライマー-X1 (配列番号 : 50)、プライマー-K1 (配列番号 : 58) およびプライマー-X2 (配列番号 : 50)、プライマー-K2 (配列番号 : 49) およびプライマー-X2 (配列番号 : 59)、プライマー-K2 (配列番号 : 57) およびプライマー-X2 (配列番号 : 59) を用いて PCR 反応を行った。該反応における反応液の組成は前記 pTB2254 DNA 10ng を鏡型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE 社) 1 μ l 量、各プライマーセットを各 0.5 μ M, dNTPs を 200 μ M、および酵素に添付のバッファーを 5 μ l 加え、50 μ l の液量とした。PCR 反応は、94°C・1 分の後、96°C・20 秒、65°C・30 秒、72°C・3 分のサイクルを 40 回繰り返し、最後に 72°C・7 分の伸長反応を行った。

該 PCR 反応産物およびホタル・ルシフェラーゼ発現プラスミドベクター-pGIV-B2(ニッポンジーン社)を制限酵素 KpnI (10U)、XbaI (10U) で 37°C、一夜切断処理した。18%アガロースゲル電気泳動し、1.3 Kbp DNA 断片 (K2X1)、450 bp DNA 断片 (K3X1)、1.8 Kbp DNA 断片 (K2X2)、0.8 Kbp DNA 断片 (K2X2)、4.8 Kbp DNA 断片 (pGIV-B2) を切り出し、ケルエクストラクションキット (QIAGEN 社) を用いて DNA を抽出し、ライゲーションキット (宝酒造社) の処方に従い、ヒト SGLT ホモログ遺伝子上流領域を pGIV-B2 へサブクリッピングした。これを大脳臍 DNA に導入し、DNA を特異的クローニングを、アンシンリンを含む LB 寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、ヒト SGLT ホモログ遺伝子上流領域 DNA 配列 K2X1, K3X1, K2X2, K2X2 を得た(図 14)。

実施例 2.3 ヒト SGLT ホモログ遺伝子上流領域+レポータープラスミド導入細胞の作製

プロモーターを含まないホタル・ルシフェラーゼ発現プラスミドベクター pGIV-B2 (ニッポンジーン社)、SV40 ウィルス初期エンハンサー/プロモーター +

ホタル・ルシフェラーゼ発現プラスミドベクター-pGIV-C2 (ニッポンジーン社)、ヒト SGLT ホモログ遺伝子上流領域+レポータープラスミド K1X1 (CA), K1X1 (CT), K1X1 (TA), K1X1 (TT), K2X1, K3X1, K2X2, K3X2 各 0.5 μ g と内部標準化するためのコントロールとして pRL-TK 単純ヘルペスウィルスのミニシンキナーゼプロモーター下流にシーバンジー・ルシフェラーゼを発現する、ニッポンジーン社) 0.5 μ g と FUGENE 6 (Roche 社) 3 μ l を Opti-MEM (Gibco-BRL 社) 50 μ l に添加し 15 分間室温で放置した後、ヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞 (1×10^6 細胞/0.2 ml 10%FBS 添加 DMEM 培地/48 well plate) に各サンプル 4 well ずつ 10 μ l/well 添加するごとににより導入処理し、2 日間培養した。

10 プロモーター活性は、ピッカジーンデュアル・シーバンジー (ニッポンジーン社) を用いて測定した。HepG2 細胞を PBS (200 μ l) で 2 回洗浄し、添付の細胞溶解剤を各ウェルに 30 μ l ずつ添加し、室温で 15 分間振とうした。細胞溶解液を各ウェル 10 μ l ずつ 96 ウエルフルオブラックプレート (大日本製薬) に移した。ルシフェラーゼによる発光量の測定は、Luminoskan RS (Labsystems 社) を用いた。ホタル・ルシフェラーゼ活性はピッカジーン発光試薬 II を各ウェル 50 μ l ずつ添加し、測定遅延時間 1 秒後、5 秒間発光量を測定した。その後シーバンジー・ルシフェラーゼ活性は、シーバンジー発光試薬を各ウェル 50 μ l ずつ添加し、測定遅延時間 1 秒後、5 秒間発光量を測定した。プロモーター活性は、各ウェルのホタル・ルシフェラーゼ活性のシーバンジー・ルシフェラーゼ活性に対する比率で示した(図 15)。X1K3 領域が、ヒト SGLT ホモログのプロモーター活性に必須であること、K1K3 領域があれさらにプロモーター活性が高まることがわかった。SNP は、CA, CT, TA 型の順ではプロモーター活性に差はないが、TT 型は活性が低下することがわかった。

実施例 2.4 ヒト SGLT ホモログの SNP 解析

20 ヒト SGLT ホモログプロモーター内の SNP をそれぞれ SNP-P1, SNP-P2 とし、構造遺伝子内の SNP を SNP-C1, SNP-C2, SNP-C3 とし、それぞれについて PCR フラグメント直接シークエンス法で配列を確認した。該反応における反応液の組成は、ヒトゲノム DNA (BCP 社) 200ng を鏡型として使用し、Pfu Turbo DNA polymerase (STRATAGENE 社) 1 μ l 量、dNTPs を 200 μ M、および酵素に添付のバッフ

アーケーを $5\mu\text{l}$ 加えた。SNP-P1、P2 についてはプライマー 2-9 (配列番号: 6-0)、およびプライマー 3-0 (配列番号: 6-1) を各 $0.6\mu\text{l}$ 加え、 $50\mu\text{l}$ の液量とした。

同様に SNP-C1 についてはプライマー 3-2 (配列番号: 6-3)、およびプライマー 3-3 (配列番号: 6-4) を、SNP-C2 についてはプライマー 3-5 (配列番号: 6-6)、およびプライマー 3-6 (配列番号: 6-7) を、SNP-C3 についてはプライマー 3-8 (配列番号: 6-9)、およびプライマー 3-9 (配列番号: 7-0) をそれぞれ使用した。

PCR 反応はいずれも $94^\circ\text{C}\cdot1$ 分の後、 $96^\circ\text{C}\cdot20$ 秒、 $57^\circ\text{C}\cdot30$ 秒、 $72^\circ\text{C}\cdot30$ 秒のサイクルを 40 回繰り返し、最後に $72^\circ\text{C}\cdot7$ 分の伸長反応を行った。該 PCR 反応産物を 2% アガロースゲルで電気泳動し、 500bp の DNA 断片を切り出し、ゲルエクストラクションキット (QIAGEN 社) を用いて DNA を $30\mu\text{l}$ 量抽出した。抽出した DNA $5\mu\text{l}$ に対し、 $5\times$ sequencing buffer (QIAGEN 社) $4\mu\text{l}$ を加えた。SNP-P1、P2 についてはプライマー 3-1 (配列番号: 6-2) を 3.2pmol を加え、 $20\mu\text{l}$ の液量とした。同様に SNP-C1 についてはプライマー 3-4 (配列番号: 6-6) を、SNP-C2 についてはプライマー 3-7 (配列番号: 6-8) を、SNP-C3 についてはプライマー 4-0 (配列番号: 7-1) をそれぞれ使用した。シーケンス反応は $94^\circ\text{C}\cdot1$ 分の後、 $96^\circ\text{C}\cdot10$ 秒、 $50^\circ\text{C}\cdot5$ 秒、 $60^\circ\text{C}\cdot4$ 分のサイクルを 25 回繰り返し、 $72^\circ\text{C}\cdot7$ 分の伸長反応を行った。該反応産物を Sephadex-G50 superfine (AMMASHAM ファルマシア社) で精製した後、 $100^\circ\text{C}\cdot3$ 分処理し、氷冷した。ABI3700 Autosequencer で SNP 部位の塩基配列を決定した。結果を図 16 に示す。SNP-CJ を除いては健常人 66 例中においても SNP の発現が確認された。

古漢集

配列番号：1、配列番号：15または配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは差質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質は糖尿病等の診断マーカー等として有用であり、該タンパク質を用いるスクリーニング法により得られる該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物は、例えば、糖尿病、高脂血症などの疾患の予防・治療剤として使用することができます。

アーキュリ加えた。SNP-P₁、P₂についてはプライマー-2 9 (配列番号：6 0)、およびプライマー-3 0 (配列番号：6 1)を各0.6 μM 加え、50 μLの液量とした。

同様に SNP-C1 についてはプライマー-3 2 (配列番号：6 3)、およびプライマー-3 3 (配列番号：6 4)を、SNP-C2 についてはプライマー-3 5 (配列番号：6 6)、およびプライマー-3 6 (配列番号：6 7)を、SNP-C3 についてはプライマー-3 8 (配列番号：6 9)、およびプライマー-3 9 (配列番号：7 0)をそれぞれ使用した。

PCR 反応はいずれも 94°C・1 分の後、96°C・20 秒、57°C・30 秒、72°C・30 秒のサイクルを 40 回繰り返し、最後に 72°C・7 分の伸長反応を行った。該 PCR 反応産物を 2% アガロースゲルで電気泳動し、500bp の DNA 断片を切り出し、ゲルエクストラクションキット (QIAGEN 社) を用いて DNA を 30 μL 量抽出した。抽出した DNA 5 μLに対し、5× sequencing buffer (PEバイオシステムズジャパン社) 4 μL、Bigdye Terminator RR Mix (PEバイオシステムズジャパン社) 4 μL を加えた。SNP-P₁、P₂についてはプライマー-3 1 (配列番号：6 2) を 3.2 pmol を加え、20 μL の液量とした。同様に SNP-C1 についてはプライマー-3 4 (配列番号：6 5)を、SNP-C2 についてはプライマー-3 7 (配列番号：6 8)を、SNP-C3 についてはプライマー-4 0 (配列番号：7 1)をそれぞれ使用した。シーケンス反応は 94°C・1 分の後、96°C・10 秒、50°C・5 秒、60°C・4 分のサイクルを 25 回繰り返し、72°C・7 分の伸長反応を行った。該反応産物を Sephadex-G50 superfine (アマチャムファルマシア社) で精製した後、100°C・3 分処理し、氷冷した。ABI3700 Autosequencer で SNP 部位の塩基配列を決定した。結果を図 16 に示す。SNP-C2 を除いては健常人 68 例中においても SNP の発現が確認された。

産業上の利用可能性

配列番号：1、配列番号：1 5または配列番号：2 6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質は糖尿病等の診断マーカー等として有用であり、該タンパク質を用いるスクリーニング法により得られる該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物は、例えば、糖尿病、高脂血症などの疾患の予防・治療薬として使用することができます。

請求の範囲

- 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質
- 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。
- 配列番号：15または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。
- 配列番号：15または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列を含有する酵母3醣鎖のタンパク質またはその塩。
- 酵母項1記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。
- 酵母項3記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。
- 酵母項1記載のタンパク質または酵母項5記載の部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA。
- 酵母項3記載のタンパク質または酵母項6記載の部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA。
- 配列番号：2で表わされる塩基配列を有する酵母項7記載のDNA。
- 配列番号：7で表わされる塩基配列を有する酵母項7記載のDNA。
- 配列番号：16または配列番号：27で表わされる塩基配列を有する酵母項8記載のDNA。
- 酵母項7記載のDNAを含有する組換えベクター。
- 酵母項8記載のDNAを含有する組換えベクター。
- 酵母項12記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
- 酵母項13記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
- 酵母項14記載の形質転換体を培養し、酵母項1記載のタンパク質または酵母項5記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項1記載のタンパク質もしくは酵母項6記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法。
- 酵母項15記載の形質転換体を培養し、酵母項3記載のタンパク質または酵母項6記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする

請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法。

18. 請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。

19. 請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。

20. 請求項 7 記載のDNAを含有してなる医薬。

21. 請求項 8 記載のDNAを含有してなる医薬。

22. 請求項 1 または請求項 3 記載のタンパク質をコードするポリスクレオチドを含有するポリスクレオチドもしくは請求項 5 または請求項 6 記載の部分ペプチドをコードするポリスクレオチドを含有するポリスクレオチドを含有することを特徴とする診断剤。

23. 請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

24. 請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

25. 請求項 2, 3 または請求項 4 記載の抗体を含有することを特徴とする診断剤。

26. 請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

27. 請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

28. 請求項 7 または請求項 8 記載のDNAのプロモータ下流にレポーター遺伝子を挿入したDNAを含有する組換えベクターで形質転換させた形質転換体を用いることを特徴とする、請求項 1 もしくは請求項 3 記載のタンパク質または請求項 5 もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドの発現を促進または抑制する化合物また

はその塩のスクリーニング方法。

29. 請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

30. 請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

31. 請求項 2, 6 記載のスクリーニング方法または請求項 2, 9 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩。

32. 請求項 2, 7 記載のスクリーニング方法または請求項 3 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩。

33. 請求項 2, 6 記載のスクリーニング方法または請求項 2, 9 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩。

34. 請求項 2, 7 記載のスクリーニング方法または請求項 3 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩。

35. 請求項 2, 6 記載のスクリーニング方法または請求項 2, 9 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

36. 請求項 2, 7 記載のスクリーニング方法または請求項 3 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

- 3.7. 請求項2-6記載のスクリーニング方法または請求項2-9記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項1記載のタンパク質もしくは請求項5記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。
6. 3.8. 請求項2-7記載のスクリーニング方法または請求項3-0記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項3記載のタンパク質もしくは請求項6記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。)
- 3.9. 糖尿病の予防・治療剤である請求項1.8または請求項2.0記載の医薬。
10. 4.0. 糖尿病の予防・治療剤である請求項1.9または請求項2.1記載の医薬。
- 4.1. 糖尿病の予防・治療剤である請求項3.5記載の医薬。
- 4.2. 糖尿病の予防・治療剤である請求項3.6記載の医薬。
- 4.3. 高脂血症の予防・治療剤である請求項3.7記載の医薬。
- 4.4. 高脂血症の予防・治療剤である請求項3.8記載の医薬。
15. 4.5. 糖尿病・高脂血症の診断剤である請求項2.2または請求項2.5記載の診断剤。
- 4.6. 請求項1.1もしくは請求項3記載のタンパク質をコードするボリヌクレオチドを含有するボリヌクレオチドまたは請求項5.1もしくは請求項6記載の部分ペプチドをコードするボリヌクレオチドを含有するボリヌクレオチドを用いることを特徴とする糖尿病・高脂血症の診断方法。
20. 4.7. 請求項2.3または請求項2.4記載の抗体を用いることを特徴とする糖尿病・高脂血症の診断方法。
- 4.8. 哺乳動物に対して、請求項3.1または請求項3.2記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする糖尿病の予防・治療方法。
- 4.9. 哺乳動物に対して、請求項3.3または請求項3.4記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする高脂血症の予防・治療方法。
25. 5.0. 糖尿病の予防・治療剤を製造するための請求項3.1または請求項3.2記載の化合物またはその塩の使用。
- 5.1. 高脂血症の予防・治療剤を製造するための請求項3.3または請求項3.4記載の化合物またはその塩の使用。

- 5.2. 配列番号：2、配列番号：1.6または配列番号：2.7で表される塩基配列を含有するDNAの一塩基多型(SNPs)体。
- 5.3. 配列番号：4.0、配列番号：4.2または配列番号：4.5の何れかで表される塩基配列を含有する請求項5.2記載の一塩基多型(SNPs)体。
- 5.4. 請求項5.2記載の一塩基多型(SNPs)体にコードされるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。
- 5.5. 配列番号：4.1、配列番号：4.3または配列番号：4.6の何れかで表されるアミノ酸配列を含有する請求項5.4記載のタンパク質またはその塩。
- 5.6. 配列番号：5.1で表される塩基配列を含有するDNA。
10. 5.7. 配列番号：5.1で表される塩基配列を含有するDNAの一塩基多型(SNPs)体。
- 5.8. 配列番号：5.4、配列番号：5.5または配列番号：5.6の何れかで表される塩基配列を含有する請求項5.7記載の一塩基多型(SNPs)体。
- 5.9. 請求項5.2記載の一塩基多型(SNPs)体を含有する組換えベクター。
15. 6.0. 請求項5.6記載のDNAまたは請求項5.7記載の一塩基多型(SNPs)体を含有する組換えベクター。
- 6.1. 請求項5.9記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
- 6.2. 請求項6.0記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
- 6.3. 請求項6.1記載の形質転換体を培養し、請求項5.4記載のタンパク質を生成、)
20. 著性せしめ、これを採取することを特徴とする請求項5.4記載のタンパク質またはその塩の製造法。
- 6.4. 請求項5.2記載の一塩基多型(SNPs)体を含有してなる医薬。
- 6.5. 請求項5.4記載のタンパク質またはその塩を含有してなる医薬。
- 6.6. 糖尿病または高脂血症の予防・治療剤である請求項6.4または請求項6.5記
25. 載の医薬。
- 6.7. 請求項5.2または請求項5.7記載の一塩基多型(SNPs)体を含有してなる診断剤。
- 6.8. さらに、配列番号：2、配列番号：1.6、配列番号：2.7または配列番号：
- 5.1で表される塩基配列を含有するDNAまたはその一部を含有する請求項6.7

記載の診断剤。

69. 糖尿病または高脂血症の診断剤である請求項67記載の診断剤。

70. 請求項52または請求項57記載の一塩基多型(SNPs)体を解析することを特徴とする糖尿病または高脂血症の診断方法。

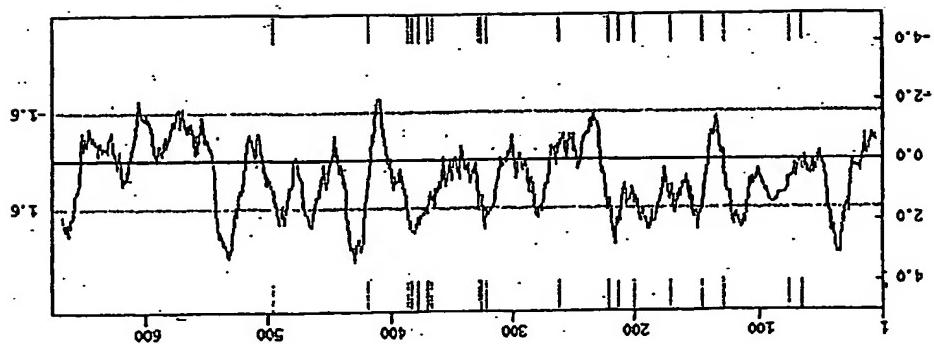
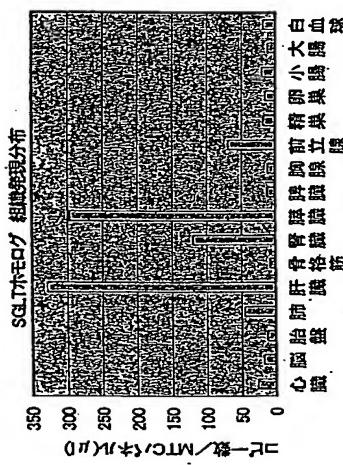
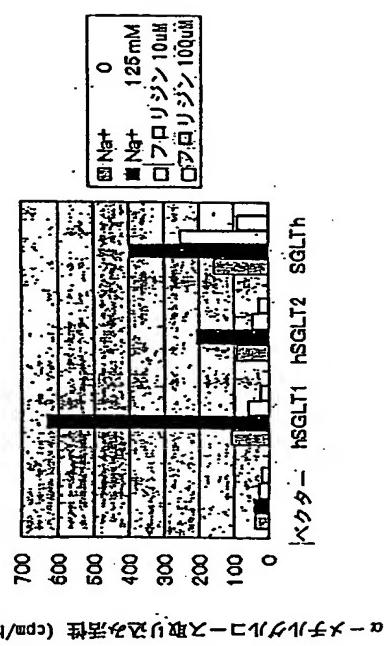


図1

2/16



2



33

8/16

學習者用紙 (規則26)

BEST AVAILABLE COPY

4/16

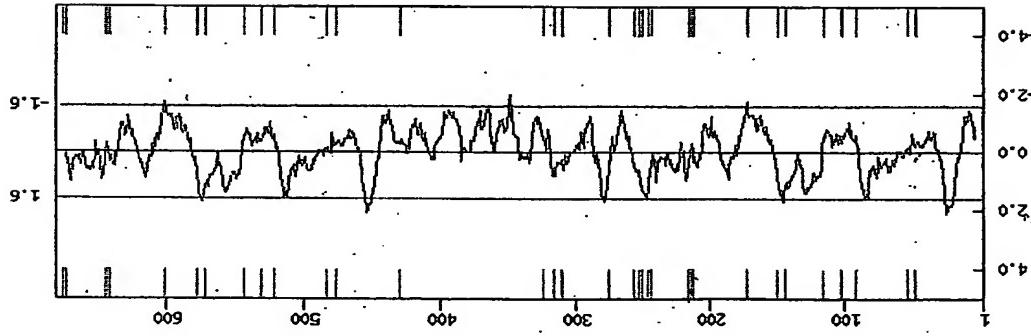


図4

基質用紙 (規則26)

5/16

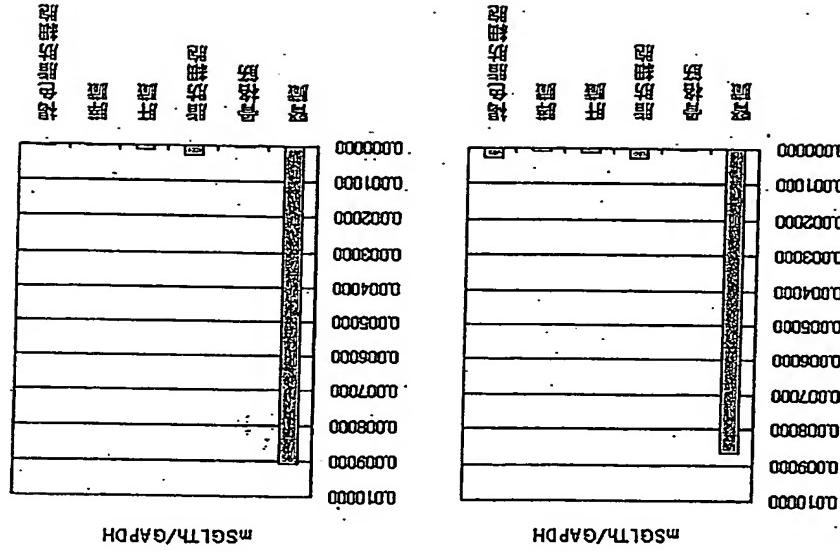


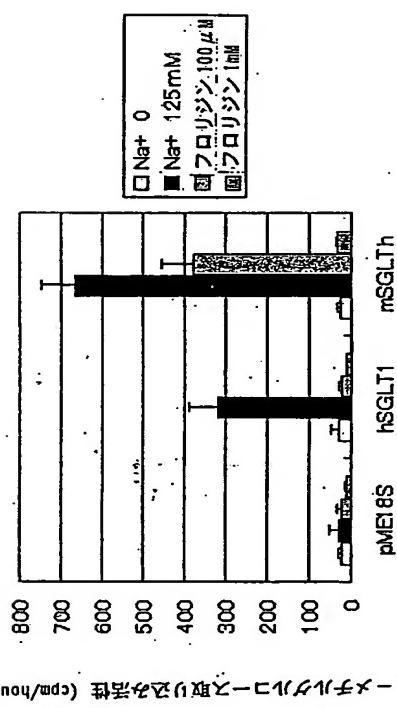
図5

基質用紙 (規則26)

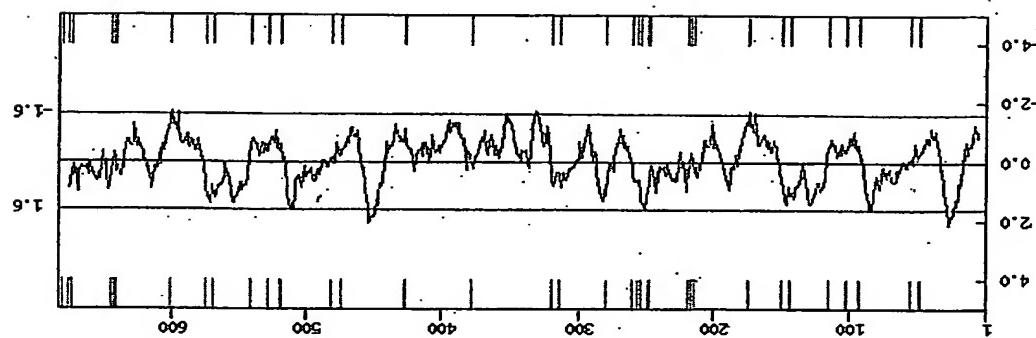
BEST AVAILABLE COPY

6/16

図6



7/16



差替え用紙(規則26)

差替え用紙(規則26)

BEST AVAILABLE COPY

図 8

9/16

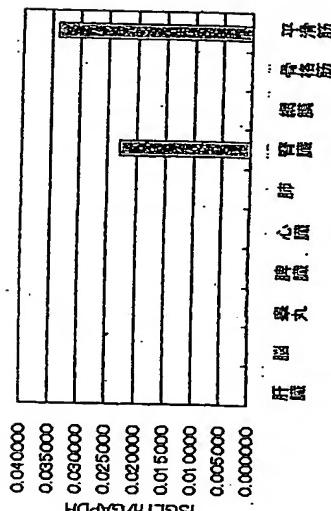
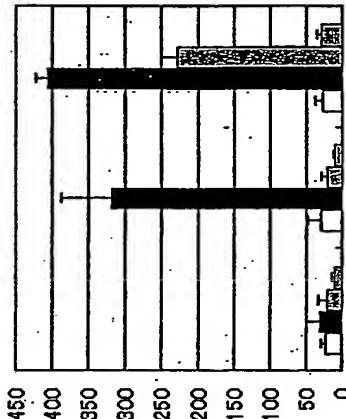
 α -メチルジエキドーアセトアミド活性 (cpm/hour)450
400
350
300
250
200
150
100
50
0Na⁺ 0
■ Na⁺ 125mM
□ フロリジン 100 μM
△ フロリジン 1 mM

図 9

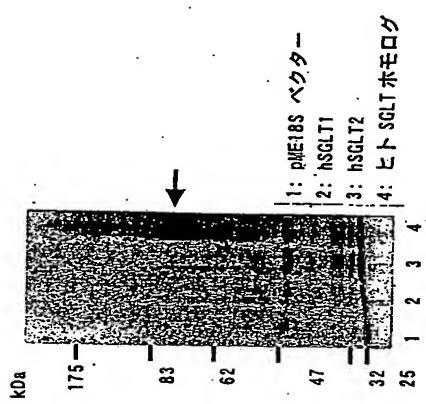
9/16

pME8S hSGLT1 SGLT1



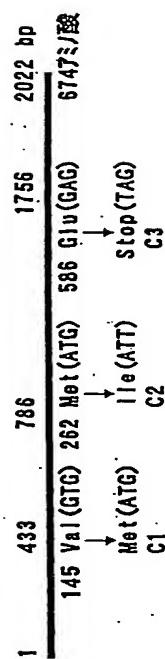
10/16

図1.0



11/16

図1.1



13/16

-1500 -600 -100 +1 bp

CTAATG C A T HNF5 PPAR TATA HNF4 IS-1

CTAATG C A T HNF5 PPAR TATA HNF4 IS-1

图 13

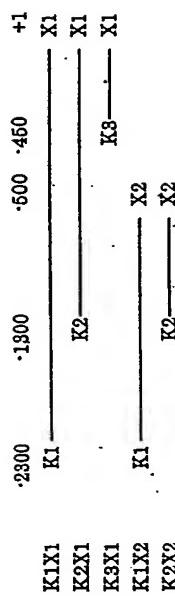
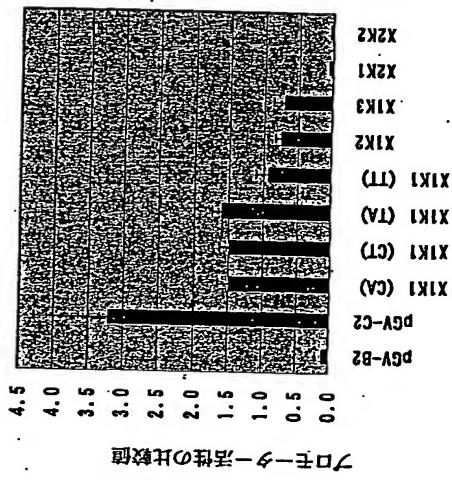


图 14

14/16

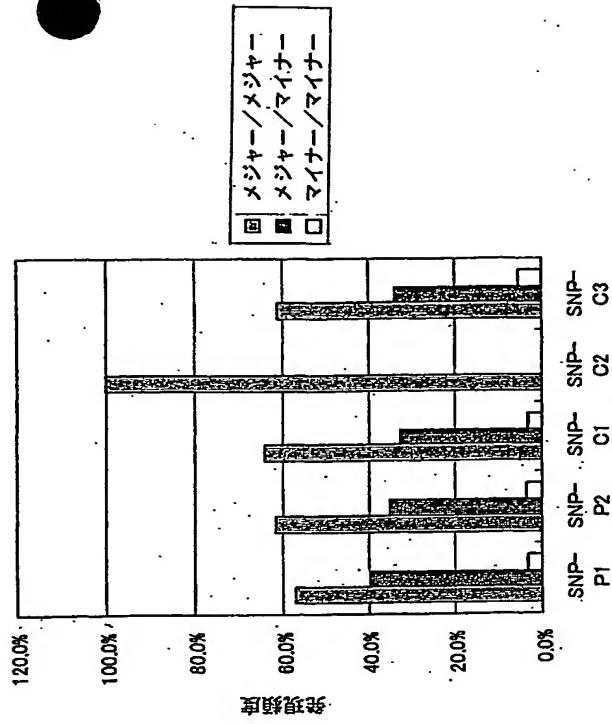
16/16

図 15



16/16

図 16



1/50

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Protein and Its DNA

<130> 2847W00P

<150> JP 2000-403078

<151> 2000-12-28

<156> JP 2001-195467

<157> 2001-06-27

<160> 71

)

10 <210> 1

<211> 674

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

15 Met Gly Pro Gly Ala Ser Gly Asp Gly Val Arg Thr Glu Thr Ala Pro

5 10 15

His Ile Ala Leu Asp Ser Arg Val Gly Leu His Ala Tyr Asp Ile Ser

20 25 30

Val Val Val Ile Tyr Phe Val Ile Ala Val Gly Ile Trp Ser

)

20 Ser Ile Arg Ala Ser Arg Gly Thr Ile Gly Tyr Phe Leu Ala Gly

50 55 60

Arg Ser Met Ser Trp Trp Pro Ile Gly Ala Ser Leu Met Ser Ser Asn

65 70 75 80

25 Val Gly Ser Gly Leu Phe Ile Gly Leu Ala Gly Thr Trp Leu Leu

85 90 95

Gly Leu Ala Val Gly Gly Phe Glu Trp Asn Ala Thr Trp Leu Leu

100 105 110

Ala Leu Gly Trp Val Phe Val Pro Val Tyr Ile Ala Ala Gly Val Val

2/50

116 120 125

Thr Met Pro Gln Tyr Leu Lys Arg Phe Gly Gly Gln Arg Ile Gln

130 135 140

Val Tyr Met Ser Val Leu Ser Leu Ile Phe Thr Lys Ile

6 145 150 155

Ser Thr Asp Ile Phe Ser Gly Ala Leu Phe Ile Gln Met Ala Leu

165 170 175

Trp Asn Leu Tyr Leu Ser Thr Gly Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Val

180 185 190

)

10 Tyr Thr Ile Ala Gly Gly Leu Met Ala Val Ile Tyr Thr Asp Ala Leu

195 200 205

Gln Thr Val Ile Met Val Gly Gly Ala Leu Val Met Phe Leu Gly

210 215 220

Phe Gln Asp Val Gly Trp Tyr Pro Gly Leu Glu Gln Arg Tyr Arg Gln

15 225 230 235

Ala Ile Pro Asn Val Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His Leu Pro Arg

245 250 255

Pro Asp Ala Phe His Met Leu Arg Asp Pro Val Ser Gly Asp Ile Pro

260 265 270

)

20 Trp Pro Gly Leu Ile Phe Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr Trp Cys Trp

275 280 285

Cys Thr Asp Gln Val Ile Val Gln Arg Ser Leu Ser Ala Lys Ser Leu

290 295 300

Ser His Ala Lys Gly Gly Ser Val Leu Gly Tyr Leu Lys Ile Leu

25 305 310 315

Pro Met Phe Phe Ile Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg Ala Leu Phe

325 330 335

Pro Asp Glu Val Gly Cys Val Asp Pro Asp Val Cys Gln Arg Ile Cys

340 345 350

3/50

Gly Ala Arg Val Gly Cys Ser Asn Ile Ala Tyr Pro Lys Ile Val Met

4/50

9/50

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 8

22

<213> Artificial Sequence
<220>

<213> Artificial Sequence
<400> 8

5

ggtcgtgggg ggctcgat tg
<210> 9
<211> 23

<213> Artificial Sequence
<220>

<213> Artificial Sequence
<400> 9

10

<213> Artificial Sequence
<220>

<213> Artificial Sequence
<400> 9

10

aggctgcgc tgggtatgg aac
<210> 10
<211> 22

<213> Artificial Sequence
<220>

<213> Artificial Sequence
<400> 10

16

<213> Artificial Sequence
<220>

<213> Artificial Sequence
<400> 10

16

cccgatgttt tccacatct tc
<210> 11
<211> 22

<213> Artificial Sequence
<220>

<213> Artificial Sequence
<400> 11

20

acaatgacct gggttgttca cc
22

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 12

acatccttg gccaggatc atttcggt

28

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 13

ggggggggaa ggatccagggt gta

23

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 14

gcaatataca gcccccttag ac

22

<210> 15

<211> 678

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 15

10/50

11/50

Met Glu Pro Gly Val Ser Arg Asn Gly Val Arg Thr Glu Thr Thr Thr
 5 10 15

Asn Pro Ser Leu Gly Leu His Thr Tyr Asp Ile Val Val Val Ile
 20 25 30

6 Tyr Phe Val Phe Val Ala Val Gly Ile Trp Ser Ser Ile Arg Ala
 35 40 45

Ser Arg Gly Thr Val Gly Gly Tyr Phe Leu Ala Gly Arg Ser Met Thr
 50 55 60

) Trp Trp Pro Ile Gly Ala Ser Leu Met Ser Ser Asn Val Gly Ser Gly
 10 65 70 75 80

) Leu Phe Ile Gly Leu Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Leu Ala Val
 85 90 95

Gly Gly Phe Glu Trp Asn Ala Thr Phe Leu Leu Ala Leu Gly Trp
 100 105 110

15 Ile Phe Val Pro Val Tyr Ile Ala Ala Gly Val Val Thr Met Pro Gln
 115 120 125

Tyr Lys Lys Arg Phe Gly Gly Gln Arg Ile Gln Val Tyr Met Ser
 130 135 140

) Val Leu Ser Leu Ile Leu Tyr Ile Phe Thr Ilys Ile Ser Thr Asp Ile
 20 145 150 155 160

Phe Ser Gly Ala Leu Phe Ile Gln Met Ala Leu Gly Trp Asn Leu Tyr
 165 170 175

Leu Ser Thr Val Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Val Tyr Thr Ile Ala,
 180 185 190

25 Gly Gly Leu Thr Ala Val Ile Tyr Thr Asp Ala Leu Gln Thr Val Ile
 195 200 205

Met Val Gly Gly Ala Leu Val Met Phe Leu Gly Phe Gln Glu Val
 210 215 220

) Gly Trp Tyr Pro Gly Leu Gln Gln Leu Tyr Arg Gln Ala Ile Pro Asn

11/50

225 230 235 240

Thr Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His Leu Pro Arg Pro Asp Ala Phe
 245 250 255 260

) His Met Leu Arg Asp Pro Val Asn Gly Asp Ile Pro Trp Pro Gly Leu
 265 270

Ile Phe Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr Trp Cys Trp Cys Thr Asp Gln
 275 280 285

) Val Ile Val Gln Arg Ser Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser His Ala Lys
 290 295 300

) 10 Gly Gly Ser Val Leu Gly Gly Tyr Leu Lys Ile Leu Pro Met Phe Phe
 305 310 315

Ile Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg Ala Leu Tyr Pro Asp Glu Val
 325 330 335

) Ala Cys Val Asp Pro Asp Ile Cys Gln Arg Val Cys Gly Ala Arg Val
 15 340 345 350

Gly Cys Ser Asn Ile Ala Tyr Pro Iys Leu Val Met Ala Leu Met Pro
 355 360 365

) Val Gly Leu Arg Gly Leu Met Ile Ala Val Ile Met Ala Ala Leu Met
 370 375 380

) 20 Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ser Thr Leu Phe Ala Ile
 385 390 395

Asp Val Trp Gln Arg Phe Arg Arg Gln Ala Ser Gln Gln Glu Leu Met
 405 410 415

) Val Val Gly Arg Leu Phe Val Val Phe Leu Val Ile Ser Ile Leu
 420 425 430

Trp Ile Pro Ile Ile Gln Ser Ser Asn Ser Gln Gln Leu Phe Asp Tyr
 435 440 445

Ile Gln Ser Ile Thr Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Ile Thr Ala Leu Phe
 450 455 460

13/50

1450

<21>	20339	CAGGCTTACAT
<212>	DNA	
<213>	Mous	
<400>	16	
5	atggaccaat	
	gggcataat	
	ggaaatttgggt	
	agatccatgtt	
	ttaatttatccat	
10	ttggaaatcgaaa	
	gcttgtatgggg	
	ggtgacalgtttt	
	tttctctgggg	
	aatcttgttttt	
	acatgttttttt	
15	tttttttttttttt	
	tttttttttttttt	
	tttttttttttttt	
	tttttttttttttt	
20	tttttttttttttt	
	tttttttttttttt	
	tttttttttttttt	
	tttttttttttttt	
25	tttttttttttttt	
	tttttttttttttt	
	tttttttttttttt	
	tttttttttttttt	

17/50

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 23

ctcgagccca acaaatcttc acatcg

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 24

atctctatgt tccagcaatg 18

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 25

accaggctgg ggiaaggcaat

<210> 26

<211> 681

<212> PRT

<213> Rat

<400> 26

Met Glu Pro Gly Ala Ser Arg Asp Gly Leu Arg Ala Glu Thr Thr His

18/50

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 23

ctcgagccca acaaatcttc acatcg

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 24

atctctatgt tccagcaatg 18

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 25

accaggctgg ggiaaggcaat

<210> 26

<211> 681

<212> PRT

<213> Rat

<400> 26

Met Glu Pro Gly Ala Ser Arg Asp Gly Leu Arg Ala Glu Thr Thr His

17/50

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 23

ctcgagccca acaaatcttc acatcg

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 24

atctctatgt tccagcaatg 18

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 25

accaggctgg ggiaaggcaat

<210> 26

<211> 681

<212> PRT

<213> Rat

<400> 26

Met Glu Pro Gly Ala Ser Arg Asp Gly Leu Arg Ala Glu Thr Thr His

19/50

Ile Pro Asn Val Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His Leu Pro Arg Ser

245 250 255

Asp Ala Phe His Met Leu Arg Asp Pro Val Asn Gly Asp Ile Pro Trp

260 266 270

6 Pro Gly Ile Phe Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr Trp Cys Trp Cys

275 280 285

Thr Asp Gln Val Ile Val Gln Arg Ser Leu Ser Ala Lys Ser Leu Ser

290 295 300

His Ala Lys Gly Gly Ser Val Leu Gly Tyr Leu Lys Ile Leu Pro

305 310 315

Met Phe Phe Ile Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg Ala Leu Tyr Pro

325 330 335

Asp Glu Val Ala Cys Val Asp Pro Asp Ile Cys Gln Arg Val Cys Gly

340 345 350

15 Ala Arg Val Gly Cys Ser Asn Ile Ala Tyr Pro Lys Leu Val Met Ala

355 360 365

Leu Met Pro Val Gly Leu Arg Gly Leu Met Ile Ala Val Ile Met Ala

370 375 380

Ala Leu Met Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ser Thr Leu

20 385 390 395

Phe Ala Ile Asp Val Trp Gln Arg Val Arg Arg Gln Ala Ser Glu Gln

405 410 415

Glu Leu Met Val Val Gly Arg Leu Phe Val Val Phe Leu Val Leu Ile

420 425 430

25 Ser Ile Leu Trp Ile Pro Ile Gln Ser Ser Asn Ser Gln Leu

435 440 445

Phe Asp Tyr Ile Gln Ser Ile Thr Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Ile Thr

450 455 460

Ala Leu Phe Leu Ala Ile Phe Cys Lys Arg Val Thr Glu Pro Gly

19/50

Ile Pro Asn Val Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His Leu Pro Arg Ser

245 250 255

Ala Phe Trp Gly Leu Met Phe Gly Leu Val Val Gly Ile Leu Arg Met

485 490 495

Ile Leu Glu Phe Ser Tyr Ser Ala Pro Ala Cys Gly Glu Lys Asp Arg

6 500 505

Arg Pro Ala Val Leu Lys Asp Phe His Tyr Leu Tyr Phe Ala Leu Leu

515 520 525

Leu Cys Gly Leu Thr Ala Ile Ile Ile Val Ile Ile Ser Phe Phe Thr

530 535 540

10 Glu Pro Ile Pro Asp Glu Lys Leu Ala Arg Leu Thr Trp Trp Thr Arg

545 560 560

Ser Cys Pro Ile Ser Glu Leu Gln Lys Val Ser Val Ser Val Asn

565 570 575

Asn Thr Glu Ser Asp Asn Ser Pro Ala Leu Ala Gly Arg Pro Val Met

580 585 590

Glu Gly Thr Ala Gly Asp Glu Glu Ala Asn Thr Thr Ser Glu Pro

595 600 605

Glu Gln Pro Glu Val Leu His Arg Ser Trp Gly Lys Trp Leu Trp Asn

610 615 620

20 Trp Phe Cys Gly Leu Ser Gly Thr Pro Gln Gln Ala Leu Ser Pro Ala

625 630 640

Glu Lys Ala Glu Leu Gln Lys Leu Thr Ser Ile Glu Glu Pro

645 650 655

Leu Trp Arg Cys Val Cys Asn Ile Asn Ala Ile Ile Leu Leu Ala Ile

25 660 665 670

Asn Ile Phe Leu Trp Gly Tyr Phe Ala

675 680 681

<210> 27

<211> 2043

22/50

24/50

	<211>	22
	<212>	DNA
	<213>	Artificial Sequence
	<220>	
5	<223>	Primer
	<400>	34
	tgcacggacc	aggtagatgt gc
	<210>	36
	<211>	22
10	<212>	DNA
	<213>	Artificial Sequence
	<220>	
	<223>	Primer
	<400>	35
	tctggagatca	gcctgcacac ct
	<210>	36
	<211>	22
	<212>	DNA
	<213>	Artificial Sequence
20	<220>	
	<223>	Primer
	<400>	36
	cagcccttc	acgttggcc tc ag
	<210>	37
25	<211>	16
	<212>	PRF
	<213>	Human
	<400>	37
	His Met Leu Arg Asp Pro Val Ser Gly Asp Ile Pro Trp Pro Gly Cys	

27/50

<212> PRT
<213> Human
<400> 41

Met Gly Pro Gly Ala Ser Gly Asp Gly Val Arg Thr Glu Thr Ala Pro
5 5 10 15

His Ile Ala Leu Asp Ser Arg Val Gly Leu His Ala Tyr Asp Ile Ser
20 25 30

Val Val Ile Tyr Phe Val Phe Val Ile Ala Val Gly Ile Trp Ser
35 40 45

))

10 Ser Ile Arg Ala Ser Arg Gly Thr Ile Gly Gly Tyr Phe Leu Ala Gly
50 55 60

Arg Ser Met Ser Trp Trp Pro Ile Gly Ala Ser Leu Met Ser Ser Asn
65 70 75 80

Val Gly Ser Gly Leu Phe Ile Gly Leu Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly
15 85 90 95

Gly Leu Ala Val Gly Gly Phe Glu Trp Asn Ala Thr Trp Leu Leu
100 105 110

Ala Leu Gly Trp Val Phe Val Pro Val Tyr Ile Ala Ala Gly Val Val
115 120 125

))

20 Thr Met Pro Gln Tyr Leu Lys Arg Phe Gly Gly Gin Arg Ile Gin
130 135 140

Met Tyr Met Ser Val Leu Ser Leu Ile Leu Ile Phe Thr Lys Ile
145 150 155 160

Ser Thr Asp Ile Phe Ser Gly Ala Leu Phe Ile Gln Met Ala Leu Gly
25 165 170 175

Trp Asn Leu Tyr Leu Ser Thr Gly Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Val
180 185 190

Tyr Thr Ile Ala Gly Gly Leu Met Ala Val Ile Tyr Thr Asp Ala Leu
195 200 205

27/50

Gln Thr Val Ile Met Val Gly Gly Ala Leu Val Leu Met Phe Leu Gly
210 215 220

Phe Gln Asp Val Gly Trp Tyr Pro Gly Leu Glu Gln Arg Tyr Arg Gln
225 230 235 240

6 Ala Ile Pro Asn Val Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His His Leu Pro Arg
245 250 255

Pro Asp Ala Phe His Met Leu Arg Asp Pro Val Ser Gly Asp Ile Pro
260 265 270

))

10 Trp Pro Gly Leu Ile Phe Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr Trp Cys Trp
275 280 285

Cys Thr Asp Gln Val Ile Val Gln Arg Ser Leu Ser Ala Lys Ser Leu
290 295 300

Ser His Ala Lys Gly Gly Ser Val Leu Gly Gly Tyr Leu Lys Ile Leu
305 310 315 320

15 Pro Met Phe Ile Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg Ala Leu Phe
325 330 335

Pro Asp Glu Val Gly Cys Val Asp Pro Asp Val Cys Gln Arg Ile Cys
340 345 350

Gly Ala Arg Val Gly Cys Ser Asn Ile Ala Tyr Pro Lys Leu Val Met
20 355 360 365

Ala Leu Met Pro Val Gly Leu Arg Gly Leu Met Ile Ala Val Ile Met
370 375 380

Ala Ala Leu Met Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ser Ser Thr
385 390 395 400

25 Leu Phe Thr Ile Asp Val Trp Gln Arg Phe Arg Arg Lys Ser Thr Glu
405 410 415

Gln Glu Leu Met Val Val Gly Arg Val Phe Val Val Phe Leu Val Val
420 425 430

Ile Ser Ile Leu Trp Ile Pro Ile Ile Gln Ser Ser Asn Ser Gly Gln
440 445 450

29/50

445

Leu Phe Asp Tyr Ile Glu Ala Val Thr Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Ile		
450	455	460
Thr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ile Phe Cys Lys Arg Val Thr Glu Pro		
465	470	475
Gly Ala Phe Trp Gly Leu Val Phe Gly Leu Gly Val Gly Leu Leu Arg		
485	490	495
Met Ile Leu Glu Phe Ser Tyr Pro Ala Pro Ala Cys Gly Glu Val Asp		

Met Ile Leu Glu Ile Ser Tyr Pro Ala Pro Ala Cys Gly Glu Val Asp	500	605	510
Arg Arg Pro Ala Val Leu Lys Asp Phe His Tyr Leu Tyr Phe Ala Ile	515	620	525
Leu Leu Cys Gly Leu Thr Ala Ile Val Ile Val Ile Val Ser Leu Cys	530	635	540
Thr Thr Pro Ile Pro Glu Glu Gln Leu Thr Arg Leu Thr Trp Trp Thr	545	650	555
Arg Asn Cys Pro Leu Ser Glu Leu Glu Lys Glu Ala His Glu Ser Thr	560	665	570

Pro	Glu	Ile	Ser	Glu	Arg	Pro	Ala	Gly	Glu	Cys	Pro	Ala	Gly	Gly	
565							570							576	
580								585						590	
Ala	Ala	Glu	Asn	Ser	Ser	Leu	Gly	Gln	Glu	Glu	Pro	Glu	Ala	Pro	Ser

33/50

325 330 335

Pro Asp Glu Val Gly Cys Val Asp Pro Asp Val Cys Gln Arg Ile Cys

340 345 350

Gly Ala Arg Val Gly Cys Ser. Asn Ile Ala Tyr Pro Lys Leu Val Met

6 355 360 365

Ala Leu Met Pro Val Gly Leu Arg Gly Ile Ala Val Ile Met

370 375 380

Ala Ala Leu Met Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ser Thr

385 390 395 400

Leu Phe Thr Ile Asp Val Trp Gln Arg Phe Arg Arg Lys Ser Thr Glu

405 410 415

Gln Glu Leu Met Val Val Gly Arg Val Phe Val Val Phe Leu Val Val

420 425 430

Ile Ser Ile Leu Trp Ile Pro Ile Ile Gln Ser Ser Asn Ser Gln

16 435 440 445

Leu Phe Asp Tyr Ile Gln Ala Val Thr Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Ile

450 455 460

Thr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ile Phe Cys Lys Arg Val Thr Glu Pro

465 470 475

Arg Ala Phe Trp Gln Leu Val Phe Gly Leu Gly Val Gly Leu Leu Arg

485 490 495

Met Ile Leu Glu Phe Ser Tyr Pro Ala Pro Ala Cys Gly Glu Val Asp

500 505 510

Arg Arg Pro Ala Val Leu Lys Asp Phe His Tyr Leu Tyr Phe Ala Ile

26 515 520 525

Leu Leu Cys Gly Leu Thr Ala Ile Val Ile Val Ser Leu Cys

530 535 540

Thr Thr Pro Ile Pro Glu Glu Gln Leu Thr Arg Leu Thr Trp Trp Thr

545 550 555

34/50

Arg Asn Cys Pro Leu Ser Glu Leu Glu Lys Glu Ala His Glu Ser Thr

565 570 575

Pro Glu Ile Ser Glu Arg Pro Ala Gly Glu Cys Pro Ala Gly Gly Gly

580 585 590

6 Ala Ala Asn Ser Ser Leu Gly Glu Gln Pro Glu Ala Pro Ser

595 600 605

Arg Ser Trp Gly Lys Leu Leu Trp Ser Trp Phe Cys Gly Leu Ser Gly

610 615 620

Thr Pro Glu Gln Ala Leu Ser Pro Ala Glu Lys Ala Ala Leu Glu Gln

625 630 640

Lys Leu Thr Ser Ile Glu Glu Pro Leu Trp Arg His Val Cys Asn

645 650 655

Ile Asn Ala Val Leu Leu Ala Ile Asn Ile Phe Leu Trp Gly Tyr

660 665 670

15 Phe Ala

674

<210> 44

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 44

ggacttagtct accccgcggg ccctcgcgtat

25 <210> 45

<211> 1755

<212> DNA

<213> Human

<400> 45

۱۶۰

37/50

180 185 190

Tyr Thr Ile Ala Gly Gly Leu Met Ala Val Ile Tyr Thr Asp Ala Leu

195 200 205

Gln Thr Val Ile Met Val Gly Gly Ala Leu Val Leu Met Phe Leu Gly

5 210 215 220

Phe Gln Asp Val Gly Trp Tyr Pro Gly Leu Glu Gln Arg Tyr Arg Gln

225 230 235

Ala Ile Pro Asn Val Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His Leu Pro Arg

245 250 255

)

10 Pro Asp Ala Phe His Met Leu Arg Asp Pro Val Ser Gly Asp Ile Pro

260 265 270

Trp Pro Gly Leu Ile Phe Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr Trp Cys Trp

275 280 285

Cys Thr Asp Gln Val Ile Val Gln Arg Ser Leu Ser Ala Lys Ser Leu

15 290 295 300

Ser His Ala Lys Gly Gly Ser Val Leu Gly Tyr Leu Lys Ile Leu

305 310 315

Pro Met Phe Phe Ile Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg Ala Leu Phe

325 330 335

)

20 Pro Asp Glu Val Gly Cys Val Asp Pro Asp Val Cys Gln Arg Ile Cys

340 345 360

Gly Ala Arg Val Gly Cys Ser Asn Ile Ala Tyr Pro Lys Leu Val Met

355 360 365

Ala Leu Met Pro Val Gly Leu Arg Gly Leu Met Ile Ala Val Ile Met

25 370 375 380

Ala Ala Leu Met Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ser Thr

385 390 395

Leu Phe Thr Ile Asp Val Trp Gln Arg Phe Arg Arg Lys Ser Thr Glu

405 410 415

38/50

180 185 190

Tyr Thr Ile Ala Gly Gly Leu Met Ala Val Ile Tyr Thr Asp Ala Leu

195 200 205

Gln Thr Val Ile Met Val Gly Gly Ala Leu Val Leu Met Phe Leu Gly

5 210 215 220

Phe Gln Asp Val Gly Trp Tyr Pro Gly Leu Glu Gln Arg Tyr Arg Gln

225 230 235

Ala Ile Pro Asn Val Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His Leu Pro Arg

245 250 255

)

10 Pro Asp Ala Phe His Met Leu Arg Asp Pro Val Ser Gly Asp Ile Pro

260 265 270

Trp Pro Gly Leu Ile Phe Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr Trp Cys Trp

275 280 285

Cys Thr Asp Gln Val Ile Val Gln Arg Ser Leu Ser Ala Lys Ser Leu

15 290 295 300

Ser His Ala Lys Gly Gly Ser Val Leu Gly Tyr Leu Lys Ile Leu

305 310 315

Pro Met Phe Phe Ile Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg Ala Leu Phe

325 330 335

)

20 Pro Asp Glu Val Gly Cys Val Asp Pro Asp Val Cys Gln Arg Ile Cys

340 345 360

Gly Ala Arg Val Gly Cys Ser Asn Ile Ala Tyr Pro Lys Leu Val Met

355 360 365

Ala Leu Met Pro Val Gly Leu Arg Gly Leu Met Ile Ala Val Ile Met

25 370 375 380

Ala Ala Leu Met Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ser Thr

385 390 395

Leu Phe Thr Ile Asp Val Trp Gln Arg Phe Arg Arg Lys Ser Thr Glu

405 410 415

Gly Ala Phe Trp Gly Leu Val Phe Gly Leu Gly Val Gly Leu Leu Arg

10 485 490 495

Met Ile Leu Gln Phe Ser Tyr Pro Ala Pro Ala Cys Gly Glu Val Asp

500 505 510

Arg Arg Pro Ala Val Leu Lys Asp Phe His Tyr Leu Tyr Phe Ala Ile

515 520 525

15 Leu Leu Cys Gly Leu Thr Ala Ile Val Ile Val Ser Leu Cys

530 535 540

Thr Thr Pro Ile Pro Glu Gln Leu Thr Arg Leu Thr Trp Trp Thr

545 550 555

Arg Asn Cys Pro Leu Ser Glu Leu Gln Ala His Glu Ser Thr

560 565 570

)

20 Pro Glu Ile Ser Glu Arg Pro Ala Gly

580 585 595

<210> 47

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 47

48/50

PCT/JP01/11557

WO 02/053738

44/50

PCT/JP01/11557

47/50

48/50

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 69
6 ggacatgggg agtttacttgtt gtc
<210> 60
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
) 10 <220>
<223> Primer
<400> 60
ttaggggg cttttttttt tttttttt
<210> 61
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 61
caaggctggg ttgttttttttttttttt
<210> 62
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
) 20 <220>
<223> Primer
<400> 62
aggccaaatc ttttttttttttttttttt
21

<210> 63
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
6 <210>
<223> Primer
<400> 63
gaatccatcca aggtttttttttttttt
<210> 64
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<210> 61
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 64
cttttttttttttttttttttttttttttt
<210> 65
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 65
ggccatccac agccatccac t
22

49/50

<223> Primer

<400> 66

ggc1gggcgtt ctcggggatc a

<210> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 67

gacaggccat tttttttttt g

<210> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 68

gacaggccat ttttttttt g

<210> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 69

tagcacatgc ctggggatca g

<210> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

50/50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 70

cgatggaaag gagtttgggt gata

<210> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 71

tgttttttgtt acttttttgtt ttgt

24

<210> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 71

tgttttttgtt acttttttgtt ttgt

24

<210> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 72

<210> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/11557

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/11557

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl? C12N15/12, C12P21/02, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12B5/10, A61K38/00, A61K45/00, A61K48/00, A61P3/06, A61P3/10, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification symbols)
MEDLINE, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), SWISSPROT/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Int. Cl? C12N15/12, C12P21/02, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12B5/10, A61K38/00, A61K45/00, A61K48/00, A61P3/06, A61P3/10, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TARPEY, P. et al., "Amino acid sequence and the cellular location of the Na (+)-dependent D-glucose symporters (SGU1) in the ovine enterocyte and the parotid acinar cell", Biochem. J., (1995), 312:293-300	1-30,39,40, 45,52-69
A	PAJOS, A. M., "Sequence of a putative transporter from rabbit kidney related to the Na+/glucose cotransporter gene family", Biochim. Biophys. Acta, (1994), 1194 (2):349-351	1-30,39,40, 45,52-69
A	TURK, B., MARTIN, M. G., WRIGHT, B. M., "Structure of the human Na+/Glucose cotransporter gene", Scint., J. Biol. Chem., 27 MAY, 1994, 269(21):15204-9.	1-30,39,40, 45,52-69
A	YANG, Q. et al., "Expression characteristics and relevance of sodium glucose cotransporter-1 in mammalian renal tubulogenesis", Am. J. Physiol. Renal Physiol., (2000), 279 (4):F765-777	1-30,39,40, 45,52-69

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents. "I" indicates publication after the international filing date or priority date and is not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention. "X" indicates document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone. "Y" indicates document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified). "Z" indicates document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means. "W" indicates document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed.

Date of the actual completion of the international search
20 February, 2002 (20.02.02) Date of mailing of the international search report
05 March, 2002 (05.03.02)

Name and mailing address of the I/A/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.
---------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際出願番号 PCT/JP01/11657			
<p>A. 明示の與する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl' C12P21/02, C07K14/47, C07K16/16, C12N15/15, C12N19/19, C12N21/21, C12N5/10, A61K38/00, A61K15/12, A61K15/06, A61P3/06, A61P3/10, A61P3/53</p> <p>B. 開きを行った分野 開きを行った最小限資料科 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl' C12N15/12, C12P21/02, C07K14/47, C07K16/18, C12N15/15, C12N19/19, C12N21/21, C12N5/10, A61K38/00, A61K5/00, A61K8/00, A61P3/06, A61P3/10, A61P3/53</p>			
<p>最小限資料以外の資料で開きを行った分野に含まれるもの</p>			
<p>国際標準で使用した電子データベース (データベースの名称、開きに使用した用語)</p> <p>MEDLINE, BIOSIS/DLLCC, WPI/DTAplus</p> <p>Striato/PtR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBS/GeneSeq</p>			
<p>C. 開通すると思められる文献</p>			
引用文献の カテゴリ**	引用文献名 及び一部の箇所が開通するときは、その開通する箇所の表示	開通する 箇所の範囲の番号	
A	TARPPY P. et al. Amino acid sequence and the cellular location of the Na(+) -dependent D-glucose symporters (GLUT) in the ovine enterocyte and the parotid acinar cell. Biochem. J. 1995, 312:293-300	1-30, 39, 40, 45, 52-69	
A	PAJOR A.M. Sequence of a putative transporter from rabbit kidney related to the Na+/glucose cotransporter gene family. Biochim. Biophys. Acta 1994, 1194 (2):349-351	1-30, 39, 40, 45, 52-69	
<p>□ C欄の書きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パンツファミリーに関する別紙を参照。</p>			
<p>* 引用文献のカテゴリ 「A」特に開通のある文献ではなく、一般的な技術水準を示す。 「E」国際出願日前の出版物または検索であるが、国際出願日以後に公表された文献 「I」以降に公表された文献をもととしたもの 「L」参考構成に裏付ける文献又は他の文献の発行 「O」日本しくは他の特典による理由を付す 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張となる出願</p>			
国際開延を完了した日 20. 02. 02.		05.03.02	
国際開延報告の発送日			
<p>国際開延報告の名前及びひらがな 日本国特許庁 (ISA/JP)</p> <p>郵便番号 100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員) 上級 並</p> <p>電話番号 03-3681-1101 内線 3448</p>	<p>4B <input checked="" type="checkbox"/> 3037</p> <p>年月日 </p>

国際特許検索結果			
C(候補)、関連すると想われる文献	引用文献名、及び一冊の範囲が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する範囲の番号	国際出願番号 PCT/JP01/11557
A C(候補)、関連すると想われる文献	引用文献の カテゴリー*		
A C(候補)、関連すると想われる文献	TURK B, MARTIN MG, WRIGHT EM. Structure of the human Na ⁺ /glu- cose cotransporter gene SGLT1. J Biol Chem. 1994 May 27; 269 (21):16204-9.	1-30, 39, 40, 45, 52-69	1-30, 39, 40, 45, 52-69
A C(候補)、関連すると想われる文献	YANG Q, et al. Expression characteristics and relevance of s- odium glucose cotransporter-1 in mammalian renal tubulogenes- is. Am J Physiol Renal Physiol. 2000, 279 (4):F765-77	1-30, 39, 40, 45, 52-69	1-30, 39, 40, 45, 52-69

第1類 情求の範囲の一部の検査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)
法第8条第3項 (PCT第17条(2)(a)) の規定により、この国際検査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 情求の範囲 46-49.70 は、この国際検査報告が検査することを要しない対象に係るものである。
請求の範囲 46～49.70 に記載された発明は、ヒトの身体の治療による処置方法又は診断方法に係るものである。

2. 情求の範囲 31-38, 41-44, 50, 51 は、有意味な国際検査をすることができる程度まで肯定の要件を満たしていない
ない国際出願の部分に係るものである。つまり、
情求の範囲 3 1～3 8 に記載の「化合物」及び「塩」について、明細書の記載を参照しても、具体的に
どのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのであるのかが全く不明である。また、前記情
求の範囲 3 1～3 8 を引用する情求の範囲 41～44, 50 及び 51 の記載も同様の理由により不明で
ある。したがって、前記請求の範囲は著しく不明確である。

3. 情求の範囲 は、從属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に
従って記載されていない。

第II部 発明の單一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようによこの国際出願にニシ以上的差異があるとこの国際検査報告は認めた。

1. 出願人が必要な追加検査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際検査報告は、すべての検査可能な請求
の範囲について作成した。
2. 追加検査手数料を要求するまでもなく、すべての検査可能な請求の範囲について検査することができたので、追
加検査手数料の納付を求めなかつた。
3. 出願人が必要な追加検査手数料を一冊のみしか期間内に納付しなかつたので、この国際検査報告は、手数料の納
付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. されていいる発明に係る次の請求について作成した。

追加検査手数料の算定の申立てに関する注意

追加検査手数料の納付と共に提出し从ら異議申立てがあつた。

追加検査手数料の納付と共に提出し从ら異議申立てがなかつた。